

**TITLE, & APPLICANT'S & INVENTORS' NAME LIST**



[Title of the Invention]

Tumor Antigen

[Applicant] ITOH, Kyogo

[Address] 25-9, Keyakidai 2-chome, Kiyama-machi, Miyaki-gun,  
Saga 841-0205 Japan

[Inventor] ITOH, Kyogo

[Address] 25-9, Keyakidai 2-chome, Kiyama-machi, Miyaki-gun,  
Saga 841-0205 Japan



発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

JC925 U.S. PTO  
10/062257  
02/01/02

出願人代理人

庄 司 隆

殿

あて名

〒 101-0032

東京都千代田区岩本町3丁目2番10号  
SN岩本町ビル6階 ユニード国際特許事務所

PCT

国際予備審査報告の送付の通知書

(法施行規則第57条)  
〔PCT規則71.1〕発送日  
(日.月.年)

13.11.01

出願人又は代理人  
の書類記号

GP00-1017

重要な通知

国際出願番号

PCT/JP00/05220

国際出願日

(日.月.年) 03.08.00

優先日

(日.月.年) 05.08.99

出願人（氏名又は名称）  
伊東 恭悟

1. 国際予備審査機関は、この国際出願に関して国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、それらをこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

2. 国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、すべての選択官庁に通知するために、それらの写しを国際事務局に送付する。

3. 選択官庁から要求があったときは、国際事務局は国際予備審査報告（付属書類を除く）の英語の翻訳文を作成し、それをその選択官庁に送付する。

## 4. 注 意

出願人は、各選択官庁に対し優先日から30月以内に（官庁によってはもっと遅く）所定の手続（翻訳文の提出及び国内手数料の支払い）をしなければならない（PCT39条（1））（様式PCT/IB/301とともに国際事務局から送付された注を参照）。

国際出願の翻訳文が選択官庁に提出された場合には、その翻訳文は、国際予備審査報告の付属書類の翻訳文を含まなければならない。

この翻訳文を作成し、関係する選択官庁に直接送付するのは出願人の責任である。

選択官庁が適用する期間及び要件の詳細については、PCT出願人の手引き第Ⅱ巻を参照すること。

名称及びあて名

日本国特許庁（IPEA/JP）

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特 許 庁 長 官

4N

9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



## 注 意

### 1. 文献の写しの請求について

国際予備審査報告に記載された文献であって国際調査報告に記載されていない文献の複写

特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することもできますが、独立行政法人工業所有権総合情報館（特許庁庁舎2階）で公報類の閲覧・複写および公報以外の文献複写等の取り扱いをしています。

〔担当及び照会先〕

〒100-0013 東京都千代田区霞が関3丁目4番3号（特許庁庁舎2階）  
独立行政法人工業所有権総合情報館

【公報類】 閲覧部 TEL 03-3581-1101 内線3811～2

【公報以外】 資料部 TEL 03-3581-1101 内線3831～3

また、（財）日本特許情報機構でも取り扱いをしています。

これらの引用文献の複写を請求する場合は下記の点に注意してください。

〔申込方法〕

（1）特許（実用新案・意匠）公報については、下記の点を明記してください。

○特許・実用新案及び意匠の種類

○出願公告又は出願公開の年次及び番号（又は特許番号、登録番号）

○必要部数

（2）公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。

○国際予備審査報告の写しを添付してください（返却します）。

〔申込み及び照会先〕

〒135-0016 東京都江東区東陽4-1-7 佐藤ビル

財団法人 日本特許情報機構 情報処理部業務課

TEL 03-3508-2313

注）特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。

2. 各選択官庁に対し、国際出願の写し（既に国際事務局から送達されている場合は除く）及びその所定の翻訳文を提出し、国内手数料を支払うことが必要となります。その期限については各国ごとに異なりますので注意してください。（条約第22条、第39条及び第64条(2)(a)(i)参照）



特 許 協 力 条 約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 GP00-1017	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/05220	国際出願日 (日.月.年) 03.08.00	優先日 (日.月.年) 05.08.99
国際特許分類(IPC) Int.Cl <sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/82, C07K7/00, A61K39/00, A61K39/395, A61K48/00, A61K45/00, A61P35/00, A61K38/10, G01N33/50, G01N33/15		
出願人(氏名又は名称) 伊東 恭悟		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。  <input checked="" type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で 2 ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。  I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input checked="" type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 02.03.01	国際予備審査報告を作成した日 29.10.01	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員)  新見 浩一	4N 9839
	電話番号 03-3581-1101 内線 3488	



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☐ 出願時の国際出願書類

☒ 明細書 第 1-45 ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 請求の範囲 第 1-15 項、 出願時に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
請求の範囲 第 18-20 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 図面 第 1-15 ~~ページ~~/図、 出願時に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 明細書の配列表の部分 第 1-5 ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☒ 請求の範囲 第 16, 17 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)



1. 次に関して、当該請求の範囲に記載されている発明の新規性、進歩性又は産業上の利用可能性につき、次の理由により審査しない。

- 國際出願全体

- ☒ 請求の範囲 13, 14, 15

**理由：**

- ☒ この国際出願又は請求の範囲 15 は、国際予備審査をすることを要しない  
次の事項を内容としている（具体的に記載すること）。

請求の範囲15は、人の身体の治療による処置方法、人体の診断方法に該当するものであるから、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。

- ☒ 明細書、請求の範囲若しくは図面（次に示す部分）又は請求の範囲 13, 14 の記載が、不明確であるため、見解を示すことができない（具体的に記載すること）。

請求の範囲 13 に記載の「スクリーニング方法によって得られた化合物」及び同第 14 項に記載の「スクリーニングによって得られた化合物・・を含んでなる・・医薬組成物」については、化合物として具体的にどのような化合物が含有され、どのような化合物が含有されないかが全く不明であって、前記請求項の範囲の記載は著しく不明確である。

したがって、前記請求項に記載された発明による新規性、産業上の利用可能性についての有意義な見解を示すことができない。

- ☐ 全部の請求の範囲又は請求の範囲 \_\_\_\_\_ が、明細書による十分な裏付けを欠くため、見解を示すことができない。

- ☒ 請求の範囲 15. について、国際調査報告が作成されていない。

2. ヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が実施細則の附属書C（塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン）に定める基準を満たしていないので、有効な国際予備審査をすることができない。

- ☐ 書面による配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

- ☐ フレキシブルディスクによる配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。



## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1-12, 18-20

有

請求の範囲

無

進歩性(IS)

請求の範囲

1-12, 18-20

有

請求の範囲

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲

1-12, 18-20

有

請求の範囲

無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: Kikuchi M, et. al., Identification of a SART-1-derived peptide of inducing HLA-A-A24-restricted and tumor-specific cytotoxic T, Int. J. Cancer(1999 May), Vol. 81, No. 3, p. 459-466

文献2: Koga Y, et. al., A human T cell-specific cDNA clone(YT16) encodes a protein with extensive homology to a family of protein-tyrosine kinases, Eur. J. Immunol. (1986), Vol. 16, No. 12, p. 1643-1646

文献3: Tanaka A, et. al., DNA sequence encoding the amino-terminal region of the human c-src protein: implications of sequence divergence among src-type kinase oncogenes, Mol. Cell Biol. (1987), Vol. 7, No. 5, p. 1978-1983

請求項1-12, 18-20に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献1乃至3に対して進歩性を有する。文献1乃至3には、“腫瘍特異的細胞障害性T細胞により認識されるペプチド”が記載されておらず、しかもその点は文献1乃至3から当業者といえども容易に想到し得ないものである。



特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁（国際調査機関）

出願人代理人  庄司 隆 殿  あて名  〒 101-0032  東京都千代田区岩本町3丁目9番9号 第一瀬野ビル 庄司国際特許事務所		PCT  国際調査報告又は国際調査報告を作成しない旨 の決定の送付の通知書  （法施行規則第41条） 【PCT規則44.1】
		発送日 （日.月.年） 07.11.00
出願人又は代理人 の書類記号 GP00-1017	今後の手続きについては、下記1及び4を参照。	
国際出願番号 PCT/JP00/05220	国際出願日 （日.月.年） 03.08.00	
出願人（氏名又は名称） 伊東 恭悟		

1. <input checked="" type="checkbox"/> 国際調査報告が作成されたこと、及びこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。 PCT19条の規定に基づく補正書及び説明書の提出 出願人は、国際出願の請求の範囲を補正することができる（PCT規則4.6参照）。 いつ 補正書の提出期間は、通常国際調査報告の送付の日から2月である。 詳細については添付用紙の備考を参照すること。 どこへ 直接次の場所へ The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22)740.14.35 詳細な手続については、添付用紙の備考を参照すること。
2. <input type="checkbox"/> 国際調査報告が作成されないこと、及び法第8条第2項（PCT17条(2)(a)）の規定による国際調査報告を作成しない旨の決定をこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。
3. <input type="checkbox"/> 法施行規則第44条（PCT規則40.2）に規定する追加手数料の納付に対する異議の申立てに関して、出願人に下記の点を通知する。 <input type="checkbox"/> 異議の申立てと当該異議についての決定を、その異議の申し立てと当該異議についての決定の両方を指定官庁へ送付することを求める出願人の請求とともに、国際事務局へ送付した。 <input type="checkbox"/> 当該異議についての決定は、まだ行われていない。決定されしだい出願人に通知する。
4. 今後の手続： 出願人は次の点に注意すること。 優先日から18月経過後、国際出願は国際事務局によりすみやかに国際公開される。出願人が公開の延期を望むときは、国際出願又は優先権の主張の取下げの通知がPCT規則90の2.1及び90の2.3にそれぞれ規定されているように、国際公開の事務的な準備が完了する前に国際事務局に到達しなければならない。 出願人が優先日から30月まで（官庁によってはもっと遅く）国内段階の開始を延期することを望むときは、優先日から19月以内に、国際予備審査の請求書が提出されなければならない。 国際予備審査の請求書若しくは、後にする選択により優先日から19箇月以内に選択しなかった又は第Ⅱ章に拘束されないため選択できなかったすべての指定官庁に対しては優先日から20月以内に、国内段階の開始のための所定手続を取らなければならない。

名称及びあて名 日本国特許庁（ISA/JP） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員 特 許 庁 長 官  電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 9839
--	---	---------



## 注 意

1. 国際調査報告の発送日から起算する条約第19条(1)及び規則46.1に従う国際事務局への補正期間に注意してください。
2. 条約22条(2)に規定する期間に注意してください。

### 3. 文献の写しの請求について

国際調査報告に記載した文献の複写

特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することもできますが、日本特許情報機構でもこれらの引用文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に引用文献の複写物を請求する場合は下記の点に注意してください。

#### 〔申込方法〕

- (1) 特許(実用新案・意匠)公報については、下記の点を明記してください。

○特許・実用新案及び意匠の種類

○出願公告又は出願公開の年次及び番号(又は特許番号、登録番号)

○必要部数

- (2) 公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。

○国際調査報告の写しを添付してください(返却します)。

#### 〔申込み及び照会先〕

〒135 東京都江東区東陽4-1-7 佐藤ダイヤビル  
財団法人 日本特許情報機構 サービス課  
TEL 03-5690-3900

注意 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。



## 様式PCT/ISA/220の備考

この備考は、PCT 19条の規定に基づく補正書の提出に関する基本的な指示を与えるためのものである。この備考は特許協力条約並びにこの条約に基づく規則及び実施細則の規定に基づいている。この備考とそれらの規定とが相違する場合には、後者が適用される。詳細な情報については、WIPOの出版物であるPCT出願人の手引も参照すること。

### PCT 19条の規定に基づく補正書の提出に関する指示

出願人は、国際調査報告を受領した後、国際出願の請求の範囲を補正する機会が一回ある。しかし、国際出願のすべての部分（請求の範囲、明細書及び図面）が、国際予備審査の手続においても補正できるもので、例えば出願人が仮保護のために補正書を公開することを希望する場合又は国際公開前に請求の範囲を補正する別の理由がある場合を除き、通常PCT 19条の規定に基づく補正書を提出する必要はないことを強調しておく。さらに、仮保護は一部の国のみで与えられるだけであることも強調しておく。

#### 補正の対象となるもの

PCT 19条の規定により請求の範囲のみ補正することができる。

国際段階においてPCT 34条の規定に基づく国際予備審査の手続において請求の範囲を（更に）補正することができる。

明細書及び図面は、PCT 34条の規定に基づく国際予備審査の手続においてのみ補正することができる。

国内段階に移行する際、PCT 28条（又はPCT 41条）の規定により、国際出願のすべての部分を補正することができる。

#### いつ

国際調査報告の送付の日から2月又は優先日から16月の内どちらか遅く満了するほうの期間内。しかし、その期間の満了後であっても国際公開の技術的な準備の完了前に国際事務局が補正を受領した場合には、その補正書は、期間内に受理されたものとみなすことを強調しておく（PCT規則46.1）。

#### 補正書を提出すべきところ

補正書は、国際事務局のみに提出でき、受理官庁又は国際調査機関には提出してはいけない（PCT規則46.2）。国際予備審査の請求書を提出した／する場合については、以下を参照すること。

#### どのように

1以上の請求の範囲の削除、1以上の新たな請求の範囲の追加、又は1以上の請求の範囲の記載の補正による。

差替え用紙は、補正の結果、出願当初の用紙と相違する請求の範囲の各用紙毎に提出する。

差替え用紙に記載されているすべての請求の範囲には、アラビア数字を付さなければならない。請求の範囲を削除する場合、その他の請求の範囲の番号を付け直す必要はない。請求の範囲の番号を付け直す場合には、連続番号で付け直すなければならない（PCT実施細則第205号(b)）。

補正は国際公開の言語で行う。

#### 補正書にどのような書類を添付しなければならないか

##### 書簡（PCT実施細則第205号(b)）

補正書には書簡を添付しなければならない。

書簡は国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開されることはない。これを「PCT 19条(1)に規定する説明書」と混同してはならない（「PCT 19条(1)に規定する説明書」については、以下を参照）。

書簡は、英語又は仏語を選択しなければならない。ただし、国際出願の言語が英語の場合、書簡は英語で、仏語の場合、書簡は仏語で記載しなければならない。

書簡には、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違について表示しなければならない。特に、国際出願に記載した各請求の範囲との関連で次の表示（2以上の請求の範囲についての同一の表示する場合は、まとめることができる。）をしなければならない。

- (i) この請求の範囲は変更しない。
- (ii) この請求の範囲は削除する。
- (iii) この請求の範囲は追加である。
- (iv) この請求の範囲は出願時の1以上の請求の範囲と差し替える。
- (v) この請求の範囲は出願時の請求の範囲の分割の結果である。



次に、添付する書簡中での、補正についての説明の例を示す。

1. [請求の範囲の一部の補正によって請求の範囲の項数が48から51になった場合] :  
“請求の範囲1-29、31、32、34、35、37-48項は、同じ番号のもとに補正された請求の範囲と置き換えられた。請求の範囲30、33及び36項は変更なし。新たに請求の範囲49-51項が追加された。”
2. [請求の範囲の全部の補正によって請求の範囲の項数が15から11になった場合] :  
“請求の範囲1-15項は、補正された請求の範囲1-11項に置き換えられた。”
3. [原請求の範囲の項数が14で、補正が一部の請求の範囲の削除と新たな請求の範囲の追加を含む場合] :  
“請求の範囲1-6及び14項は変更なし。請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。”又は  
“請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。その他の全ての請求の範囲は変更なし。”
4. [各種の補正がある場合] :  
“請求の範囲1-10項は変更なし。請求の範囲11-13、18及び19項は削除。請求の範囲14、15及び16項は補正された請求の範囲14項に置き換えられた。請求の範囲17項は補正された請求の範囲15、16及び17項に分割された。新たに請求の範囲20及び21項が追加された。”

“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”(PCT規則46.4)

補正書には、補正並びにその補正が明細書及び図面に与える影響についての説明書を提出することができる(明細書及び図面はPCT19条(1)の規定に基づいては補正できない)。

説明書は、国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開される。

説明書は、国際公開の言語で作成しなければならない。

説明書は、簡潔でなければならず、英語の場合又は英語に翻訳した場合に500語を越えてはならない。

説明書は、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違を示す書簡と混同してはならない。説明書を、その書簡に代えることはできない。説明書は別紙で提出しなければならず、見出しを付すものとし、その見出しは“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”の語句を用いることが望ましい。

説明書には、国際調査報告又は国際調査報告に列記された文献との関連性に関して、これらを誹謗する意見を記載してはならない。国際調査報告に列記された特定の請求の範囲に関連する文献についての言及は、当該請求の範囲の補正に関してのみ行うことができる。

#### 国際予備審査の請求書が提出されている場合

PCT19条の規定に基づく補正書及び添付する説明書の提出の時に国際予備審査の請求書が既に提出されている場合には、出願人は、補正書(及び説明書)を国際事務局に提出すると同時にその写し及び必要な場合、その翻訳文を国際予備審査機関にも提出することが望ましい(PCT規則55.3(a)、62.2の第1文を参照)。詳細は国際予備審査請求書(PCT/IPEA/401)の注意書参照。

#### 国内段階に移行するための国際出願の翻訳に関して

国内段階に移行する際、PCT19条の規定に基づいて補正された請求の範囲の翻訳を出願時の請求の範囲の翻訳の代わりに又は追加して、指定官庁/選択官庁に提出しなければならないこともあるので、出願人は注意されたい。

指定官庁/選択官庁の詳細な要求については、PCT出願人の手引きの第II巻を参照。



## P C T

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 GP00-1017	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/05220	国際出願日 (日.月.年) 03.08.00	優先日 (日.月.年) 05.08.99
出願人(氏名又は名称) 伊東 恭悟		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☒ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 15, 16 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求項15, 16は、人の身体の治療による処置方法、人体の診断方法に該当するものであるから、PCT 17条(2)(a)及びPCT規則2.9(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/82, C07K7/00, A61K39/00, A61K39/395, A61K48/00, A61K45/00, A61P35/00, A61K38/10, G01N33/50, G01N33/15

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/82, C07K7/00, A61K39/00, A61K39/395, A61K48/00, A61K45/00, A61P35/00, A61K38/10, G01N33/50, G01N33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, REGISTRY (STN), CA (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Kikuchi M, et. al., "Identification of a SART-1-derived peptide of inducing HLA-A-A24-restricted and tumor-specific cytotoxic T", Int. J. Cancer (1999 May), Vol. 81, No. 3, p. 459-466	1-14, 17
A	Koga Y, et. al., "A human T cell-specific cDNA clone (YT16) encodes a protein with extensive homology to a family of protein-tyrosine kinases", Eur. J. Immunol. (1986), Vol. 16, No. 12, p. 1643-1646	1-14, 17

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 10. 00

国際調査報告の発送日

07.11.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇



4N

9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Tanaka A, et. al., "DNA sequence encoding the amino-terminal region of the human c-src protein: implications of sequence divergence among src-type kinase oncogenes.", Mol. Cell Biol. (1987), Vol. 7, No. 5, p. 1978-1983	1-14, 17



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05220

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/82, C07K7/00, A61K39/00, A61K39/395, A61K48/00, A61K45/00, A61P35/00, A61K38/10, G01N33/50, G01N33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/82, C07K7/00, A61K39/00, A61K39/395, A61K48/00, A61K45/00, A61P35/00, A61K38/10, G01N33/50, G01N33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
SwissProt/PIR/GeneSeq, REGISTRY (STN), CA (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Kikuchi M, et. al., "Identification of a SART-1-derived peptide of inducing HLA-A-A24-restricted and tumor-specific cytotoxic T", Int. J. Cancer (1999 May), Vol.81, No.3, p.459-466	1-14,17
A	Koga Y, et. al., "A human T cell-specific cDNA clone (YT16) encodes a protein with extensive homology to a family of protein-tyrosine kinases", Eur. J. Immunol. (1986), Vol.16, No.12, p.1643-1646	1-14,17
A	Tanaka A, et. al., "DNA sequence encoding the amino-terminal region of the human c-src protein: implications of sequence divergence among src-type kinase oncogenes.", Mol. Cell Biol. (1987), Vol.7, No.5, p.1978-1983	1-14,17



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
27 October, 2000 (27.10.00)

Date of mailing of the international search report  
07 November, 2000 (07.11.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05220

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 15,16  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 15 and 16 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and diagnostic methods practiced on the human body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a) of the PCT and Rule 29(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.





1/4

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

GP00-1017

原本 (出願用) - 印刷日時 2000年08月02日 (02. 08. 2000) 水曜日 16時37分07秒

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号.	
0-2	国際出願日	
0-3	(受付印)	
0-4	様式-PCT/RO/101 この特許協力条約に基づく 国際出願願書は、 0-4-1 右記によって作成された。	PCT 03. 8. 00 受領印
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許 協力条約に従って処理されるこ とを請求する。	PCT-EASY Version 2.91 (updated 01. 07. 2000)
0-6	出願人によって指定された 受理官庁	日本国特許庁 (RO/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記 号	GP00-1017
I	発明の名称	腫瘍抗原
II	出願人	
II-1	この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
II-2	右の指定国についての出願人で ある。	すべての指定国 (all designated States)
II-4ja	氏名 (姓名)	伊東 恭悟
II-4en	Name (LAST, First)	ITOH, Kyogo
II-5ja	あて名:	841-0205 日本国 佐賀県 三養基郡基山町けやき台 2丁目25番地9号
II-5en	Address:	25-9, Keyakidai 2-chome, Kiyama-machi, Miyaki-gun, Saga 841-0205 Japan
II-6	国籍 (国名)	日本国 JP
II-7	住所 (国名)	日本国 JP
II-8	電話番号	0942-92-5477
II-9	ファクシミリ番号	0942-92-5477



IV-1	代理人又は共通の代表者、 通知のあて名 下記の者は国際機関において右 記のごとく出願人のために行動 する。	代理人 (agent)
IV-1-1ja	氏名(姓名)	庄司 隆
IV-1-1en	Name (LAST, First)	SHOJI, Takashi
IV-1-2ja	あて名:	101-0032 日本国 東京都 千代田区 岩本町3丁目9番9号 第一瀬野ビル 1階
IV-1-2en	Address:	1F, Dai-ichi Seno Bldg., 9-9, Iwamotocho 3-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0032 Japan
IV-1-3	電話番号	03-3864-6572
IV-1-4	ファクシミリ番号	03-3864-6573
IV-1-5	電子メール	taka-sho@muji.biglobe.ne.jp
IV-2	その他の代理人	筆頭代理人と同じあて名を有する代理人 (additional agent(s) with same address as first named agent)
IV-2-1ja	氏名	大島 由美子
IV-2-1en	Name(s)	OSHIMA, Yumiko
V	国の指定	
V-1	広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを 求める場合には括弧内に記載す る。)	AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZW 及びハアレプロトコルと特許協力条約の締約国で ある他の国 EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国 である他の国 EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国 である他の国 OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GW ML MR NE SN TD TG 及びアフリカ知的所有権機構と特許協力条約の締 約国である他の国
V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを 求める場合には括弧内に記載す る。)	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CR CU CZ DE DK DM DZ EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW



## 特許協力条約に基づく国際出願願書

GP00-1017

原本（出願用） - 印刷日時 2000年08月02日（02.08.2000）水曜日 16時37分07秒


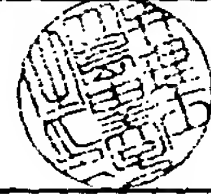
V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて、規則4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約のもとで認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、V-6欄に示した国の指定を除く。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。		
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)	
VI-1	先の国内出願に基づく優先権主張		
VI-1-1	先の出願日	1999年08月05日 (05.08.1999)	
VI-1-2	先の出願番号	特願平11-222101	
VI-1-3	国名	日本国 JP	
VI-2	優先権証明書送付の請求 上記の先の出願のうち、右記の番号のものについては、出願書類の認証謄本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁に対して請求している。	VI-1	
VII-1	特定された国際調査機関 (ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)	
VIII	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
VIII-1	願書	4	-
VIII-2	明細書（配列表を除く）	45	-
VIII-3	請求の範囲	3	-
VIII-4	要約	1	abst. txt
VIII-5	図面	15	-
VIII-6	明細書の配列表	5	-
VIII-7	合計	73	
VIII-8	添付書類 手数料計算用紙	添付 ✓	添付された電子データ -
VIII-9	別個の記名押印された委任状	✓	-
VIII-15	計算機読取可能な媒体によるマルチメディア及び/又はアミノ酸配列リスト		別個のフレキシブルディスク
VIII-16	PCT-EASYディスク	-	フレキシブルディスク
VIII-17	その他	納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面	-
VIII-17	その他	国際事務局の口座への振込を証明する書面	-
VIII-17	その他	陳述書	-
VIII-17	その他	FDの情報を記録した書面	-
VIII-18	要約書とともに提示する図の番号		
VIII-19	国際出願の使用言語名:	日本語 (Japanese)	



## 特許協力条約に基づく国際出願願書

GP00-1017

原本（出願用） - 印刷日時 2000年08月02日（02.08.2000）水曜日 16時37分07秒

IX-1	提出者の記名押印		
IX-1-1	氏名(姓名)	庄司 隆	
IX-2	提出者の記名押印		
IX-2-1	氏名(姓名)	大島 由美子	

## 受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	
10-2	図面：	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であってその後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	

## 国際事務局記入欄

11-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--



## PCT手数料計算用紙(願書付属書)

GP00-1017

原本(出願用) - 印刷日時 2000年08月02日 (02.08.2000) 水曜日 16時37分07秒

[この用紙は、国際出願の一部を構成せず、国際出願の用紙の枚数に算入しない]

0	受理官庁記入欄		
0-1	国際出願番号.		
0-2	受理官庁の日付印		
0-4	様式-PCT/R0/101 (付属書)		
0-4-1	このPCT手数料計算用紙は、 右記によって作成された。		PCT-EASY Version 2.91 (updated 01.07.2000)
0-9	出願人又は代理人の書類記号		GP00-1017
2	出願人		伊東 恭悟
12	所定の手数料の計算		金額/係数 小計 (JPY)
12-1	送付手数料 T	⇒	18,000
12-2	調査手数料 S	⇒	72,000
12-3	国際手数料		
	基本手数料 (最初の30枚まで) b1	40,700	
12-4	30枚を越える用紙の枚数	43	
12-5	用紙1枚の手数料 (X)	940	
12-6	合計の手数料 b2	40,420	
12-7	b1 + b2 = B	81,120	
12-8	指定手数料 国際出願に含まれる指定国 数	87	
12-9	支払うべき指定手数料の数 (上限は8)	8	
12-10	1指定当たりの手数料 (X)	8,800	
12-11	合計の指定手数料 D	70,400	
12-12	PCT-EASYによる料金の 減額 R	-12,500	
12-13	国際手数料の合計 (B+D-R) I	⇒	139,020
12-14	優先権証明書請求手数料 優先権証明書を請求した数	1	
12-15	1 優先権証明書当たり (X) の手数料	1,400	
12-16	優先権証明書請求手数料 の合計 P	⇒	1,400
12-17	納付すべき手数料の合計 (T+S+I+P)	⇒	230,420
12-19	支払方法	送付手数料: 特許印紙 調査手数料: 銀行口座への振込み 国際手数料: 銀行口座への振込み 優先権証明書請求手数料: 特許印紙	

EASYによるチェック結果と出願人による言及

13-1-1	出願人による言及 氏名(名称)	弁理士 (8890) 庄司隆
--------	--------------------	----------------



13-1-2	出願人による言及 氏名(名称)	弁理士(10793) 大島由美子
13-2-6	EASYによるチェック結果 内訳	Green? 要約書とともに提示する図の番号が示されてい ません。
13-2-9	EASYによるチェック結果 注釈	Green? 願書に表示しなければならない通常の項目はすべ て他のPCT-EASYの機能で入力することができます 。言及を用いた表示の有効性について確認してく ださい。
13-2-10	EASYによるチェック結果 受理官庁/国際事務局記入 欄	Green? この願書を作成したPCT-EASYは英語版ないし西欧 言語版以外のWindows上で動作しています。ASCII 文字以外の文字について、願書と電子データを注 意して比較してください。





# 手続補正書

(法第11条の規定による補正)

特許庁長官 殿



1. 国際出願の表示

PCT/JP00/05220

2. 出願人

氏名

伊東 恭悟

ITOH Kyogo

あて名

841-0205 日本国佐賀県三養基郡基山町けやき台2丁目25番地9号  
25-9, Keyakidai 2-chome, Kiyama-machi, Miyaki-gun, Saga

841-0205 Japan

国籍

日本国 Japan

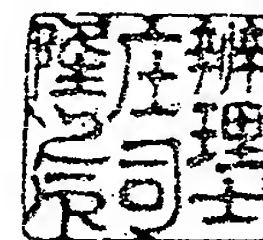
住所

日本国 Japan

3. 代理人

氏名

(8890) 弁理士 庄司 隆



SHOJI Takashi

あて名

101-0032 日本国東京都千代田区岩本町3丁目2番10号  
SN 岩本町ビル 6階  
6F, SN Iwamotocho Bldg.,  
2-10, Iwamotocho 3-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0032 Japan

4. 補正の対象

請求の範囲

5. 補正の内容

別紙のとおり

- (1) 請求の範囲第47頁第16項および第48頁第17項を削除し、第18項、第19項および第20項を追加する。

6. 添付書類の目録

- (1) 請求の範囲第47頁および第48頁



メントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチド。

8. 請求の範囲第6項または第7項に記載のポリヌクレオチドまたはその相補鎖を含有する組換えベクター。

9. 請求の範囲第8項に記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

5 10. 請求の範囲第9項に記載の形質転換体を培養する工程を含むペプチドの製造方法。

11. 請求の範囲第1項または第2項に記載のペプチドを免疫学的に認識する抗体。

10 12. 請求の範囲第1項または第2項に記載のペプチドと相互作用して、少なくともHLA-A2402拘束性および／またはHLA-A2拘束性の細胞傷害性T細胞による認識性を増強する化合物、および／または請求の範囲第6項もしくは第7項に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を増強する化合物のスクリーニング方法であって、請求の範囲第1項もしくは第2項に記載のペプチド、請求の範囲第6項もしくは第7項に記載のポリヌクレ  
15 オチド、請求の範囲第8項に記載の組換えベクター、請求の範囲第9項に記載の形質転換体、または請求の範囲第11項に記載の抗体のうちの少なくとも1つを用いることを特徴とするスクリーニング方法。

13. 請求の範囲第12項に記載のスクリーニング方法で得られた化合物。

20 14. 請求の範囲第1項もしくは第2項に記載のペプチド、請求の範囲第6項もしくは第7項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第8項に記載の組換えベクター、請求の範囲第9項に記載の形質転換体、請求の範囲第11項に記載の抗体、または請求の範囲第13項に記載の化合物のうちの少なくとも1つを癌治療有効量を含んでなる、癌治療に用いる医薬組成物。

25 15. 請求の範囲第3項に記載の細胞傷害性T細胞の誘導剤、請求の範囲第5項に記載の癌ワクチン、または請求の範囲第14項に記載の医薬組成物を癌疾患に用いることを特徴とする治療方法。

16. (削除)



17. (削除)

18. (追加) 請求の範囲第1項もしくは第2項に記載のペプチド、および／または該ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドの測定方法。

5 19. (追加) 請求の範囲第18項に記載の測定方法を利用する、請求の範囲第1項または第2項に記載のペプチドの発現または活性に関連した疾病の検査方法。

10 20. (追加) 請求の範囲第18項に記載の測定方法または請求の範囲第19項に記載の検査方法に使用する試薬キットであって、少なくとも請求の範囲第1項または第2項に記載のペプチド、請求の範囲第6項または第7項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第11項に記載の抗体のうちの1つ以上からなる試薬キット。



## 明細書

## 腫瘍抗原

## 技術分野

- 5 本発明は、新規な腫瘍抗原に関し、詳しくは腫瘍特異的細胞傷害性T細胞による認識性を有するペプチド、そのペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖、このポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、組換えベクターを含む形質転換体、ペプチドの製造方法、ペプチドに対する抗体、これらに相互作用を有する化合物およびそのスクリーニング方法、これらを利用する医薬組成物、およびこれらを利用する診断のための分析手段に関する。
- 10

## 従来技術

- 生体における癌の排除には免疫系、特に細胞傷害性T細胞 (C y t o t o x i c T L y m p h o c y t e : 以下、CTLと略称することもある) が重要な役割を果たしている。癌患者の腫瘍局所には腫瘍細胞に対して傷害活性を示す細胞傷害性T細胞の浸潤が認められている (A r c h . S u r g . , 1 2 6 : 2 0 0 - 2 0 5 , 1 9 9 0 ) 。この腫瘍特異的な細胞傷害性T細胞の標的分子である腫瘍抗原の発見は、メラノーマにおいて初めてなされた。腫瘍細胞内で生成された腫瘍抗原は、細胞内で分解されて8~11個のアミノ酸からなるペプチド (腫瘍抗原ペプチド) になり、主要組織適合性抗原であるヒト白血球抗原 (H u m a n L e u k o c y t e A n t i g e n : 以下、HLAと略称する) 分子と結合して腫瘍細胞表面上に提示される。
- 15
- 20

- HLAは細胞膜抗原であり、ほとんど全ての有核細胞上に発現している。HLAはクラスI抗原とクラスII抗原に大別されるが、細胞傷害性T細胞により抗原ペプチドとともに認識されるHLAはクラスI抗原である。HLAクラスI抗原はさらにHLA-A、B、Cなどに分類され、その遺伝子には多型が存在することが報告されている。HLA-A24対立遺伝子 (a l l e l e) は、日本人の
- 25



人口の約60%（多くはその95%の遺伝型がA2402である）、コーカサス人の20%、アフリカ人の12%でみられる。HLA-A2対立遺伝子は、日本人の約40%、中国人の53%、北コーカサス人の49%、南コーカサス人の38%、黒人アフリカ人の23%においてみられる。

- 5 このHLAに結合可能な腫瘍抗原ペプチドには、HLAの型（type）ごとにその配列に規則性（モチーフ）がある。細胞傷害性T細胞はこの腫瘍抗原ペプチドとHLAとの複合体を認識して腫瘍細胞を傷害する。ここにおいて、腫瘍抗原とは、腫瘍特異的な細胞傷害性T細胞を誘導しうる、腫瘍細胞が有する蛋白質またはペプチドを意味する。また腫瘍抗原ペプチドとは、該腫瘍抗原が腫瘍細胞  
10 内で分解されて生じるペプチドであり、HLA分子と結合して細胞表面上に提示されることにより腫瘍特異的な細胞傷害性T細胞を誘導または活性化しうるペプチドを意味する。さらに、腫瘍抗原が有する腫瘍特異的な細胞傷害性T細胞を誘導しうるアミノ酸配列の部位を腫瘍抗原エピトープ（腫瘍抗原決定基）という。

- 近年、細胞傷害性T細胞により認識されうる腫瘍抗原をコードする多くの遺伝  
15 子が、ヒトの癌細胞のcDNAから同定されている（Science, 254: 1643~1647, 1991）（J. Exp. Med., 183: 1185~1192, 1996）。これらは、HER/neu（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 432~436, 1995）、変異cdk（Science, 269: 1281~1284, 1995）、そして変異CASP-  
20 8（J. Exp. Med., 186: 785~793, 1997）などであり、増殖性細胞および悪性形質転換体中の存在が認められている。MAGE（メラノーマ抗原）ファミリー（Cancer Res., 55: 3478~3482, 1995）やSART1（J. Exp. Med. 187: 277~288, 1998）などの他のいくつかの遺伝子産物は、悪性細胞と精巢の両方で選択的に発  
25 現しているが、その他の正常細胞では発現していない。

多くのメラノーマ特異的な腫瘍抗原は、MART-1/melanA、gp100、およびチロシナーゼなどであり、これらは正常メラニン細胞にも存在する



(Oncogene Res., 1:357~374, 1987)。それゆえ、ヒトの腫瘍抗原はほとんどの場合、真に腫瘍特異抗原というのではなく、むしろそれらはいくつかの正常細胞や組織で発現する自己抗原といえる。

現在、欧米では、腫瘍抗原ペプチドを投与し、癌患者の体内の細胞傷害性T細胞を活性化させる癌ワクチン療法の開発がなされており、メラノーマ特異的腫瘍抗原については臨床試験における成果が報告されている。例えば、メラノーマ抗原gp100ペプチドをメラノーマ患者に皮下投与し、インターロイキン-2(IL-2)を静脈注射投与することにより、42%の患者で腫瘍の縮小が認められている(Nature Medicine, 4:321, 1998)。このように、腫瘍抗原はワクチンとして利用することにより、有効な癌治療効果を期待できる。

しかしながら、同定されている腫瘍抗原はそのほとんどがメラノーマ由来であり、発病頻度の高い上皮性の癌や腺癌由来の腫瘍抗原についての報告は少ない。

既存の三大癌治療(手術療法、化学療法、および放射線治療)による1998年における5年生存率は全癌で41%であるが、生存率をこれ以上増加させることは現状では難しく、上記三大治療法に加え新たな治療法の開発が望まれている。

srcファミリー膜型チロシンキナーゼの1つであるp56<sup>lck</sup>蛋白質をコードするlck遺伝子は、T細胞の発生と機能において本質的な機能を有する。このlck遺伝子の大腸癌細胞と小細胞性肺癌細胞における異常な発現(Oncogene Res., 1:357~374, 1987)、および転移性大腸癌での異所性発現が報告されている。また、腫瘍性形質転換の過程におけるLck蛋白質の関与が示唆されてはいる(Cancer Res., 58:4660~4666, 1998)が、しかしながら、これらの癌細胞におけるLck蛋白質の詳細な役割は知られていない。



## 発明の開示

本発明は上記現状に鑑み、腺癌および上皮性の癌、例えば大腸癌や肺癌の患者の特異的免疫療法に有用な、細胞傷害性T細胞による認識性を有する新規な腫瘍抗原を見だし提供することを目的とする。

- 5      具体的には、少なくともHLA-A2402拘束性またはHLA-A2拘束性の細胞傷害性T細胞により認識される、1c k遺伝子がコードする抗原エピートプを有するペプチドを見だし、提供することが本発明の目的である。詳しくは、HLA-A2402拘束性またはHLA-A2拘束性の細胞傷害性T細胞による認識性を有するペプチド、該ペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその
- 10    相補鎖、該ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体、該ペプチドの製造方法、該ペプチドに対する抗体、これらに相互作用を有する化合物およびそのスクリーニング方法、これらを利用する医薬組成物、およびこれらを利用する診断手段を提供することを目的とする。

- 課題解決のため、本発明者は、HLA-A24と腫瘍抗原ペプチドとを認識し
- 15    て活性化されるHLA-A2402拘束性腫瘍特異的細胞傷害性T細胞であるKE4-CTL、ならびにHLA-A2と腫瘍抗原ペプチドとを認識して活性化されるHLA-A2拘束性腫瘍特異的細胞傷害性T細胞であるOK-CTLおよびGK-CTLを癌患者から樹立し、この腫瘍特異的細胞傷害性T細胞を活性化し
- 20    うる腫瘍抗原を、遺伝子発現クローニング法（Gene Expression Cloning Method）を用いて、KE腫瘍細胞株のcDNAライブラリーから同定し、さらにHLA-A2402拘束性および／またはHLA-A2拘束性の細胞傷害性T細胞により認識される該腫瘍抗原のエピートプを有するペプチドを見だし、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、

- 25    (1) 配列表の配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、



または配列番号 17 に記載のアミノ酸配列からなるペプチド、

(2) 下記の式で表されるアミノ酸配列（配列表の配列番号 10）からなるペプチド、

Thr-Phe-Xaa-Xbb-Xcc-Xdd-Xee-Xff-Leu-Xgg-Asp-Xhh-Xii

5

ここで、Xaaは、AspまたはGlu、

Xbbは、TyrまたはPhe、

Xccは、LeuまたはIle、

Xddは、ArgまたはGln、

Xeeは、SerまたはAla、

10

Xffは、ValまたはPhe、

Xggは、GluまたはAsp、

Xhhは、PheまたはTyr、

Xiiは、PheまたはTyrである、

(3) 少なくとも前記 (1) または (2) のペプチドからなる細胞傷害性 T 細胞の誘導剤、

15

(4) 前記 (1) または (2) のペプチドを用いることを特徴とする細胞傷害性 T 細胞の誘導方法、

(5) 少なくとも前記 (1) または (2) のペプチドからなる癌ワクチン、

(6) 前記 (1) または (2) のペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖、

20

(7) 前記 (6) のポリヌクレオチドまたはその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチド、

(8) 前記 (6) または (7) のポリヌクレオチドまたはその相補鎖を含有する組換えベクター、

25

(9) 前記 (8) の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

(10) 前記 (9) の形質転換体を培養する工程を含むペプチドの製造方法、

(11) 前記 (1) または (2) のペプチドを免疫学的に認識する抗体、



(12) 前記(1)または(2)のペプチドと相互作用して、少なくともHLA-A2402拘束性および／またはHLA-A2拘束性の細胞傷害性T細胞による認識性を増強する化合物、および／または前記(6)もしくは(7)のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を増強する化合物のスクリー  
 5 ニング方法であって、前記(1)もしくは(2)のペプチド、前記(6)もしくは(7)のポリヌクレオチド、前記(8)の組換えベクター、前記(9)の形質転換体、または前記(11)の抗体のうちの少なくとも1つを用いることを特徴とするスクリーニング方法、

(13) 前記(12)のスクリーニング方法で得られた化合物、

10 (14) 前記(1)もしくは(2)のペプチド、前記(6)もしくは(7)のポリヌクレオチド、前記(8)の組換えベクター、前記(9)の形質転換体、前記(11)の抗体、または前記(13)の化合物のうちの少なくとも1つを癌治療有効量を含んでなる癌治療に用いる医薬組成物、

15 (15) 前記(3)の細胞傷害性T細胞の誘導剤、前記(5)の癌ワクチン、または前記(14)の医薬組成物を癌疾患に用いることを特徴とする治療方法、

20 (16) 前記(1)または(2)のペプチドの発現または活性に関連した疾病の診断方法であって、(a)該ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド、および／または(b)個体由来の試料中の該ペプチドをマーカーとして分析することを含む方法、

(17) 前記(16)の方法に使用する試薬キットであって、少なくとも前記(1)または(2)のペプチド、前記(6)または(7)のポリヌクレオチド、前記(11)の抗体のうちの1つ以上からなる試薬キット、

からなる。

25

図面の簡単な説明

図1： lck遺伝子産物を認識することにより、HLA-A24拘束性細胞傷



害性T細胞 (KE4-CTL) が活性化しインターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) を産生することを示す図である。

図2 : Lck遺伝子産物を認識することにより、HLA-A2拘束性細胞傷害性T細胞が活性化してインターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) を産生することを示す図である。(A)、(B) および (C) はそれぞれHLA-A2拘束性CTLとして、OK-CTL-e亜株、GK-CTL2-2-4亜株およびGK-CTL2-2-5亜株を用いたときの結果を示す。

図3 : Lck由来のペプチドをトランスフェクションしたC1R/A2402細胞で刺激したKE-CTLからのIFN- $\gamma$ 産生量を示す図である。

10 図4 : Lck由来のペプチドが濃度依存的にKE-CTLを活性することを示す図面である。

図5 : KE-CTLによるペプチド認識を種々の抗体存在下で行い、KE-CTLの細胞表現型 (phenotype) およびMHC拘束性を確認した結果を示す図である。(A)、(B) および (C) はそれぞれLck由来のペプチドとして、Lck208-216、Lck486-494、およびLck488-497を用いたときの結果を示す。

図6 : KE4-CTL亜株 (subline) のペプチド認識における差を示す図面である。(A)、(B)、(C) および (D) はそれぞれ亜株#19、亜株#49、亜株#93、およびクローン#80を用いた結果を示す。

20 図7 : Lck由来のペプチドが癌患者末梢血単核球 (PBMC) からHLA-A24拘束性細胞傷害性T細胞を誘導しうることを、各種腫瘍細胞、KE4 (HLA-A24<sup>+</sup>)、SW620 (HLA-A24<sup>+</sup>)、COLO201 (HLA-A24<sup>-</sup>) を標的細胞としてCTLからのIFN- $\gamma$ 産生を指標に調べた結果を示す図である。

25 図8 : Lck由来ペプチドにより誘導されるCTLの各種腫瘍細胞に対す細胞傷害性活性を、<sup>51</sup>Crの遊離試験により検討した結果を示す図である。(A) および (B) は、ペプチドとしてそれぞれLck488-497およびLck20



8-216を使用した結果を示す。

図9： 大腸癌患者の末梢血単核球（PBMC）からペプチドにより誘導されたCTLの、ペプチドに対する特異性を示す図である。（A）、（B）、（C）および（D）は、それぞれ癌患者のPBMCの事前刺激に、ペプチドを使用しなかったとき、ペプチドとしてLck208-216、Lck486-494、およびLck488-497を使用したときの結果を示す。

図10： 大腸癌患者の末梢血単核球（PBMC）からのペプチドによるCTL誘導を種々の抗体存在下で行い、誘導されたCTLの細胞表現型（phenotype）およびMHC拘束性を確認した結果を示す図である。

10 図11： 大腸癌患者の末梢血単核球（PBMC）中の、ペプチドにより誘導されるCTL前駆細胞の頻度を示す図である。図中、横軸は1ウエルあたりの加えたCTL数を表し、縦軸は増殖陰性分画（fraction negative culture）を表す。縦軸において、1はCTLが誘導されず、CTLにより溶解（lysis）されるべき標的細胞が100%生存していることを示し、  
15 0.2は標的細胞が100%死滅している（CTL前駆細胞頻度=1/96）ことを示す。

図12： Srcファミリー由来のペプチドによる、KE4-CTLの活性化を示す図である。

図13： Lck由来のペプチドのHLA-A2拘束性CTL活性化能を分析した結果を示す図であり、（A）はHLA-A2拘束性CTLとしてOK-CTL株を使用したときの結果を、（B）はGK-CTL2-2-4亜株を使用したときの結果を示す。

図14： Lck由来のペプチドが濃度依存的にHLA-A2拘束性CTLを活性化することを示す図である。（A）、（B）および（C）は、それぞれOK-CTL-e亜株、GK-CTL2-2-4亜株、およびGK-CTL2-2-5  
25 亜株をCTLとして使用したときの結果を示す。

図15： Lck由来のペプチドが癌患者末梢血単核球（PBMC）からHLA



5    -A 2 拘束性細胞傷害性 T 細胞を誘導しうることを示す図である。(A) および  
       (B) は、大腸癌患者例 1 由来の P B M C からの C T L の誘導を、I F N- $\gamma$  の  
       産生を指標に検討した結果、および細胞傷害性試験で確認した結果を示す。(C)  
       および (D) は、大腸癌患者例 2 由来の P B M C からの C T L の誘導を同様に検  
       討した結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

(l c k 遺伝子の同定)

10    本発明者らは、まず日本人の多数においてみられる H L A-A 分子の型である  
       H L A-A 2 4 に着目し、この H L A-A 2 4 と腫瘍抗原ペプチドとを認識して  
       活性化される H L A-A 2 4 0 2 拘束性腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞 (K E 4 -  
       C T L) を、食道癌患者から樹立した (Int. J. Cancer、81:45  
       9-466、1999)。この細胞傷害性 T 細胞をエフェクターとして使用し、  
 15    この細胞を活性化しうる腫瘍抗原を、遺伝子発現クローニング法を用いて、K E  
       腫瘍細胞株の c D N A ライブラリーから同定した。細胞傷害性 T 細胞の活性化の  
       判定は、酵素免疫固相法 (E L I S A) キットを用いて、該細胞傷害性 T 細胞か  
       ら産生されるインターフェロン- $\gamma$  (I F N- $\gamma$ ) を測定することにより行った。

20    その結果、1つの c D N A クローンが H L A-A 2 4 拘束性 K E 4 - C T L に  
       より認識され、該 K E 4 - C T L を活性化すること (図 1 参照)、およびこの c  
       D N A クローンの塩基配列が 1, 7 5 0 塩基 (b p) 長であり、かつ l c k 遺伝  
       子の塩基配列におけるポジション 2 8 3 - 2, 0 3 2 と 1 0 0 % 相同性を有する  
       ことを見いだした。このポジションの l c k 遺伝子の塩基配列は、5 0 9 アミノ  
       酸からなる L c k 蛋白質においてその大部分を含むポジション 3 1 - 5 0 6 のア  
       ミノ酸配列に対応する。

25    すなわち、L c k 遺伝子と H L A-A 2 4 0 2 とを遺伝子工学的手法により発  
       現させた細胞が K E - C T L を活性化せしめることから、L c k 遺伝子がコード  
       する蛋白質は、H L A-A 2 4 0 2 拘束性 C T L を活性化しうる腫瘍抗原である



ことを確認した。

また、L c k 蛋白質は、H L A - A 2 4 拘束性 C T L のみならず、H L A - A 2 拘束性 C T L をも活性化しうる腫瘍抗原であることを、大腸癌患者より樹立した C T L 株〔O K - C T L - e 亜株 ( s u b l i n e ) ( H L A - A 0 2 0 7 ) 〕  
 5 ( J . I m m u n o l . 、 1 6 3 : 4 9 9 9 - 5 0 0 4 、 1 9 9 9 ) および肺癌患者より樹立した C T L 株〔G K - C T L 2 - 2 - 4 亜株およびG K - C T L 2 - 2 - 5 ( H L A - A 0 2 0 6 ) 〕の3つのH L A - A 2 拘束性 C T L を用いて上記同様に見いだした ( 図 2 参照 ) 。

かくして、l c k 遺伝子が、H L A - A 2 4 拘束性またはH L A - A 2 拘束性  
 10 の腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞により認識される腫瘍抗原エピトープ ( t u m o r e p i t o p e ) をコードすることを見いだした。

#### ( L c k 蛋白質の組織局在 )

種々の細胞および組織における蛋白質レベルでの L c k ( 5 6 k D および 5 9  
 15 k D ) の発現を、抗 L c k モノクローナル抗体を用いてウェスタンブロット分析により検討した。

L c k 蛋白質は、扁平上皮癌 ( 以下、S C C と略称することもある ) または腺腫瘍細胞株などの試験した全ての悪性腫瘍細胞株、並びに食道癌、肺 S C C および肺腺癌細胞などの、多種の臓器から得た新鮮腫瘍組織の大多数で検出された。  
 20 特に、L c k 蛋白質は大腸癌、肺癌、食道癌の組織で、高率に発現していた。一方、非腫瘍性の結腸組織のいずれでも全く検出されなかった。また、L c k 蛋白質は未刺激の末梢血単核球 ( P B M C ) では認められなかったが、 $10 \mu g / m l$  のフィトヘマグルチニン ( p h y t o h e m a g g l u t i n i n ; P H A ) で 4 8 時間刺激した後の活性化された P B M C ( P H A - b l a s t ) の細胞質  
 25 画分には検出されるようになった。



(HLA-A2402拘束性CTLを活性化しうるペプチド)

Lck蛋白質由来のHLA-A2402分子への結合能を有するペプチドを得るために、HLA-A24に結合しうる規則的配列 (モチーフ、motif) を有するペプチドについて文献検索し、13個の異なる9-merまたは10-merのペプチドを、lck遺伝子産物の509アミノ酸配列 (Nature、319:682~685、1986) に基づいて合成した。但し、一部のアミノ酸に変更を加えたものもある。

13個のペプチドからの細胞傷害性T細胞を活性化しうる腫瘍抗原ペプチドの選択は、CTLが産生するIFN- $\gamma$ をそのCTL活性化作用の指標として測定することにより行った。

これらのペプチドのうち、3個のペプチド [Lck208-216 (配列番号3)、Lck486-494 (配列番号1)、Lck488-497 (配列番号2)] がCTL活性化能を示し、CTLによるIFN- $\gamma$ 産生を増強した (図3参照)。Lck486-494 (配列番号1) またはLck488-497 (配列番号2) のCTL活性化能は濃度依存的であり、1nM程度で認められた。一方、Lck208-216 (配列番号3) の活性は100nM以上で認められた (図4参照)。

これら3個のペプチドによるKE4-CTLの活性化は、抗CD3、抗CD8および抗MHCクラスIモノクローナル抗体によって阻害されたが、抗CD4、抗MHCクラスIIおよび抗CD13モノクローナル抗体では阻害されなかった。従って、KE4-CTLはCD3<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD4<sup>-</sup>の細胞表現型を有することが判明した。

(ペプチドによるHLA-A24拘束性細胞傷害性T細胞の誘導)

HLA-A24拘束性のKE-CTLを濃度依存的に活性化する3個のペプチド [Lck208-216 (配列番号3)、Lck486-494 (配列番号1)、Lck488-497 (配列番号2)] はまた、大腸癌患者から得た末梢血単核



球 (P B M C) から、L c k を発現している腫瘍細胞株 (K E 4、S W 6 2 0 および C O L O 2 0 1) に対する H L A - A 2 4 拘束性 C T L を誘導した。

すなわち、L c k 2 0 8 - 2 1 6 (配列番号 3)、L c k 4 8 6 - 4 9 4 (配列番号 1)、L c k 4 8 8 - 4 9 7 (配列番号 2) を用いて *i n v i t r o* で  
 5 3 回刺激し、さらに放射線照射した自己 P B M C (a u t o l o g o u s - P B M C) を相当するペプチドでパルスしたものを抗原提示細胞 (A P C) として用いて刺激したとき、特に L c k 4 8 6 - 4 9 4 (配列番号 1)、L c k 4 8 8 - 4 9 7 (配列番号 2) で刺激した P B M C は、H L A - A 2 4<sup>-</sup>腫瘍細胞 (C O L O 2 0 1) に対する反応より、H L A - A 2 4<sup>+</sup>腫瘍細胞 (K E 4 および S W  
 10 6 2 0) に対する反応においてより多くの I F N -  $\gamma$  を産生した。

一方、健常人から得た P B M C からは、抗原提示細胞 (A P C) として放射線照射した自己 P B M C に 3 個のペプチドのいずれかをパルスしたものをを用いて刺激したときは、これら 3 個のペプチドは H L A - A 2 4 拘束性 C T L を誘導しなかった (表 3 参照)。しかし、ペプチドをパルスした樹状細胞 (D e n d r i t  
 15 i c C e l l ; D C) を A P C として用いて刺激したときには、これら 3 個のペプチドは健常人から得た P B M C から、H L A - A 2 4 拘束性 C T L を誘導した。

さらに、上記ペプチドが誘導した C T L 活性を、<sup>51</sup> C r 遊離試験により確認した。これら L c k 由来の 3 個のペプチドで刺激した P B M C は、H L A - A 2 4  
 20 <sup>+</sup> K E 腫瘍細胞および S W 6 2 0 腫瘍細胞を溶解 (l y s i s) したが、健常人から得た H L A - A 2 4<sup>+</sup> P H A 活性化 T 細胞または H L A - A 2 4<sup>-</sup> C O L O 2 0 1 腫瘍細胞はいずれも溶解しなかった。

L c k 由来の上記ペプチドは大腸癌患者の P B M C において H L A - A 2 4 拘束性の腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞を誘導することができた。また、L c k 由来  
 25 のペプチドは、健常人の P B M C については、腫瘍細胞に対する H L A - A 2 4 拘束性の C T L 活性を誘導できなかった。これらの結果から、健常人の末梢血中の T 細胞は L c k に対して免疫学的寛容状態にあると考えられる。本発明の L c



k ペプチドは大腸癌患者の P B M C 中に C T L を誘導することができる。

(S r c ファミリー由来のペプチドによる H L A - A 2 4 拘束性 C T L の誘導)

H L A - A 2 4 <sup>+</sup> 腫瘍細胞株を認識する C T L を誘導することができる上記 3  
5 個のペプチドのうち、2 個のペプチド L c k 4 8 6 - 4 9 4 (配列番号 1) (T  
F D Y L R S V L) および L c k 4 8 8 - 4 9 7 (配列番号 2) (D Y L R S V  
L E D F) に、アミノ酸配列上の相同性が認められた。(以降、アミノ酸配列を  
表記する場合、1 文字にて表記する場合と 3 文字にて表記する場合がある。)

この 2 個のペプチドの重なる領域である一定のアミノ酸 D Y L R S V をエピト  
10 プとして認識する C T L は、腫瘍拒絶に対する意義を有することが推定される。

このアミノ酸配列に相同性をもつペプチドを検索したところ、L c k と同じ S  
r c ファミリーに属するチロシンキナーゼ (Ann. Rev. Biochem.  
5 4 : 8 9 7 - 9 3 0, 1 9 8 5) に、相同性を有するペプチドを含むものがある  
ことが判明した (表 5 参照)。

15 これら S r c ファミリー由来のペプチドのアミノ酸配列に基づいて合成したペ  
プチド、S r c 5 1 1 - 5 1 9 (配列番号 4 : T F E Y L Q A F L)、Y e s 5  
0 8 - 5 1 6 (配列番号 5 : T F E Y I Q S F L)、F y n 5 1 2 - 5 2 0 (配  
列番号 6 : T F E Y L Q S F L)、L y n 4 8 9 - 4 9 7 (配列番号 7 : T F D  
Y L Q S V L)、H c k 5 0 3 - 5 1 1 (配列番号 8 : T F E Y I Q S V L)、  
20 B l k 4 8 2 - 4 9 0 (配列番号 9 : T F E F L Q S V L) も、L c k 由来のペ  
プチドと同様、あるいはそれ以上の H L A - A 2 4 拘束性 C T L 活性化能を示し  
た。

上記相同性を有するペプチドのアミノ酸配列から導き出される、下記の一般式  
で表されるアミノ酸配列からなるペプチドであって、かつ少なくとも H L A - A  
25 2 4 0 2 拘束性細胞傷害性 T 細胞による認識性を有するペプチドも、本発明のペ  
プチドに含まれる。



Thr-Phe-Xaa-Xbb-Xcc-Xdd-Xee-Xff-Leu-Xgg-Asp-Xhh-Xii

ここで、Xaaは、AspまたはGlu、

Xbbは、TyrまたはPhe、

Xccは、LeuまたはIle、

5 Xddは、ArgまたはGln、

Xeeは、SerまたはAla、

Xffは、ValまたはPhe、

Xggは、GluまたはAsp、

Xhhは、PheまたはTyr、

10 Xiiは、PheまたはTyr、

である。

(Srcファミリー由来のペプチドによる癌患者におけるHLA-A24拘束性細胞傷害性T細胞の誘導)

15 上記Srcファミリー由来のペプチドは、癌患者より得たPBMCからHLA-A24拘束性細胞傷害性T細胞を誘導することができた。すなわち、Srcファミリー由来のペプチドで刺激した癌患者より得たPBMCは、KE4細胞およびSW620細胞に対して反応し、IFN- $\gamma$ を産生した。Lck486-494 (配列番号1) は癌患者7例中4例、Src511-519 (配列番号4) は  
20 3例中2例、Yes508-516 (配列番号5) は3例中1例、Fyn512-520 (配列番号6) は2例中1例、Hck503-511 (配列番号8) は2例中2例、Blk482-490 (配列番号9) は2例中1例において、PBMCからのIFN- $\gamma$ を産生を誘導した。

本発明の3個のLckペプチドおよびSrcファミリー由来のペプチドは、大  
25 腸癌患者のPBMCにおいてHLA-A24拘束性の腫瘍特異的細胞傷害性T細胞を誘導することができる。従って、本発明のペプチドは、腫瘍特異的細胞傷害性T細胞の誘導剤および誘導方法に使用可能である。また、Lckは大腸、肺お



よび食道を含む大多数の癌組織で検出される。HLA-A24対立遺伝子 (allele) は日本人の人口の約60% (多くは、その95%の遺伝型がA2402である)、コーカサス人の20%、アフリカ人の12% (HLA 1991, Vol. 1: 1065~1220, Oxford: Oxford Scientific Publications, 1992) で見られる。従って、本発明のペプチドは比較的多数の癌患者における特異的免疫治療に適用しうる。

(HLA-A2拘束性細胞傷害性T細胞を活性化しうるペプチド)

つぎに、Lck蛋白質がHLA-A2拘束性CTLによっても認識されることから、HLA-A2分子への結合能をもつLck由来のペプチドを得るために、HLA-A2に結合しうるモチーフを有するペプチドについて文献検索し、24種の異なる9-merまたは10-merのペプチドを、lck遺伝子産物の509アミノ酸配列 (Nature, 319: 682~685, 1986) に基づいて合成した。CTLとしてOK-CTL株またはGK-CTL亜株 (subline) 2-2-4を用い、各ペプチドのCTL活性化能は、CTLが産生するIFN- $\gamma$ を指標として測定した。

これらのペプチドのうち、7個のペプチド〔Lck61-69 (配列番号11)、Lck246-254 (配列番号12)、Lck294-303 (配列番号13)、Lck340-348 (配列番号14)、Lck347-355 (配列番号15)、Lck422-430 (配列番号16)、Lck492-500 (配列番号17)〕がCTL活性化能を示し、CTLによるIFN- $\gamma$ 産生を増強した〔図13の(A)および(B)参照〕。Lck61-69 (配列番号11)、Lck246-254 (配列番号12)、またはLck422-430 (配列番号16) の、CTL活性化能は濃度依存的であった〔図14の(A)、(B)および(C)参照〕。

25

(ペプチドによるHLA-A2拘束性細胞傷害性T細胞の誘導)

また、HLA-A2拘束性のCTLを濃度依存的に活性化する3個のペプチド



〔L c k 6 1 - 6 9 (配列番号 1 1)、L c k 2 4 6 - 2 5 4 (配列番号 1 2)、  
L c k 4 2 2 - 4 3 0 (配列番号 1 6)〕のうち、L c k 2 4 6 - 2 5 4 (配列  
番号 1 2) または L c k 4 2 2 - 4 3 0 (配列番号 1 6) は、転移性大腸癌患者  
の P B M C から、腫瘍細胞株である P a n c - 1、S W 6 2 0 に対する H L A -  
5 A 2 拘束性 C T L を誘導した。

すなわち、転移を有する大腸癌患者の P B M C をこれら 3 個のペプチドのいず  
れかで *in vitro* で 3 回刺激し、さらに放射線照射した自己 P B M C (a  
u t o l o g o u s - P B M C) を相当するペプチドでパルスしたものを抗原提  
示細胞 (A P C) として用いて刺激したとき、L c k 2 4 6 - 2 5 4 (配列番号  
10 1 2)、L c k 4 2 2 - 4 3 0 (配列番号 1 6) で刺激した該大腸癌患者の P B  
M C は、H L A - A 2<sup>-</sup>大腸癌細胞株 C O L O 3 2 0 に対して反応しなかったが、  
H L A - A 2<sup>+</sup>大腸癌細胞株 S W 6 2 0 や H L A - A 2<sup>+</sup>膵臓癌細胞株 P a n c  
- 1 に反応して I F N -  $\gamma$  を産生し〔図 1 5 の (A) および (C) 参照〕、H L  
A - A 2<sup>+</sup>腫瘍細胞を溶解した〔図 1 5 の (B) および (D) 参照〕。

15

(癌患者における H L A - A 2 拘束性細胞傷害性 T 細胞の誘導)

L c k 2 4 6 - 2 5 4 (配列番号 1 2) および L c k 4 2 2 - 4 3 0 (配列番  
号 1 6) は、大腸癌患者だけではなく、転移を有する肺癌患者および食道癌患者  
より得た P B M C から H L A - A 2 拘束性 C T L を誘導することができた。H  
20 L A - A 2 拘束性 C T L の誘導は、H L A - A 2<sup>+</sup>大腸癌細胞株 S W 6 2 0 に対  
する I F N -  $\gamma$  の産生を指標にして測定した。L c k 2 4 6 - 2 5 4 (配列番号  
1 2) は癌患者 6 例中 2 例、L c k 4 2 2 - 4 3 0 (配列番号 1 6) は 6 例中 3  
例において、P B M C 中に H L A - A 2 拘束性の C T L を誘導した (表 8 参照)。  
従って、これら 3 個のペプチドは、細胞傷害性 T 細胞の誘導剤および誘導方法に  
25 使用可能である。また、H L A - A 2 対立遺伝子 (a l l e l e) は日本人の人  
口の約 4 0 %、北コーカサス人の 4 9 %、南コーカサス人の 3 8 %、アフリカ人  
の 2 3 %、中国人の 5 3 % (H L A 1 9 9 1, V o l. 1 : 1 0 6 5 ~ 1 2 2



0, Oxford: Oxford Scientific Publications, 1992)で見られる。従って、これらのペプチドは比較的多数の癌患者における特異的免疫治療に適用しうる。

## 5 (ペプチド)

本発明のペプチドは、配列表の配列番号1～9または配列番号11～17に記載のアミノ酸配列からなるペプチドである。本発明のペプチドは、HLA-A24拘束性またはHLA-A2拘束性細胞傷害性T細胞を誘導または／活性化することができる。

10 また、本発明のペプチドは配列表の配列番号10に記載のアミノ酸配列からなるペプチドであって、少なくともHLA-A24拘束性細胞傷害性T細胞を誘導および／または活性化しうるペプチドでありうる。HLA-A24拘束性細胞傷害性T細胞を誘導および／または活性化しうるペプチドの選択は、後述する実施例に記載の方法を用いて行うことができる。

15 さらに、本発明のペプチドは、HLA-A24拘束性CTLとHLA-A2拘束性CTLの両方を誘導および／または活性化できるペプチドであってもよい。

このように特定されたペプチドを元にして、少なくともHLA-A2402拘束性および／またはHLA-A2拘束性の細胞傷害性T細胞による認識性の強さを指標とすることにより、1ないし数個のアミノ酸の欠失・置換・付加などの変異あるいは誘発変異を有するアミノ酸配列からなるペプチドも提供される。欠失・置換・付加などの変異あるいは誘発変異を導入する手段は自体公知であり、例えばウルマーの技術(Ulmer, L. M., Science, 219, 666, 1983)を利用することが出来る。さらに、これら利用できるペプチドは、その構成アミノ基もしくはカルボキシル基などを修飾するなど、機能の著しい変更を伴わない程度に改変が可能である。

また、Ick遺伝子のコードする蛋白質は、多型にもとづくと推定されるアミノ酸配列が若干異なるものがいくつか報告されている(Nature, 319:



682-685, 1986, Eur. J. Immunol., 16:1643-1646, 1986, J. Cell. Biochem., 38:117-126, 1988, Gene, 84:105-113, 1989)。本発明のペプチドは、このアミノ配列が異なる lck 遺伝子産物由来のペプチドであって、HLA-A 24 拘束性および／または HLA-A 2 拘束性の CTL を誘導できるものも含まれる。

例えば、本発明のペプチドの 1 つである Lck 488-497 は配列表の配列番号 2 に記載するアミノ酸配列 DYLRSVLEDF からなるが、Nature, 319:682-685, 1986 に報告されている Lck 蛋白質のアミノ酸配列に基づく 488-497 位のアミノ酸配列は DYLRSVLDDF であり、この配列も HLA-A 24 結合モチーフに含まれる。

本発明のペプチドは、HLA-A 24 拘束性および／または HLA-A 2 拘束性の腫瘍特異的細胞傷害性 CTL を誘導および／または活性化しうる腫瘍抗原ペプチドであり、腫瘍特異的細胞傷害性 CTL を誘導および／または活性化するために使用できる。すなわち、本発明のペプチドは、癌ワクチンなどとして癌の特異的免疫治療に使用できるものである。

#### (ポリヌクレオチド)

本発明のポリヌクレオチドおよびその相補鎖は、配列番号 1～9 および配列番号 11～17 に記載のペプチド、およびこれらペプチドのアミノ酸配列において 1 ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加等の変異あるいは誘発変異を有し、かつ少なくとも HLA-A 2402 拘束性および／または HLA-A 2 拘束性の細胞傷害性 T 細胞による認識性を有するペプチドのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドおよび該ポリヌクレオチドに対する相補鎖である。さらに本発明のポリヌクレオチドには、これらポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドも包含される。ポリヌクレオチド分子として DNA 分子を代表例にとると、「DNA 分子にストリンジェントな条件下で



ハイブリダイズするDNA分子」は、例えば前述のMolecular Cloningに記載の方法によって得ることができる。ここで、「ストリンジェントな条件下でハイブリタイズする」とは、例えば、 $6\times\text{SSC}$ 、 $0.5\%\text{SDS}$ および $50\%$ ホルムアミドの溶液中で $42^{\circ}\text{C}$ にて加温した後、 $0.1\times\text{SSC}$ 、 $0.5\%\text{SDS}$ の溶液中で $68^{\circ}\text{C}$ にて洗浄する条件でも依然として陽性のハイブリタイズのシグナルが観察されることを表す。

本発明のポリヌクレオチドは、いずれも本発明のペプチドの製造に有用な遺伝子情報を提供するものであり、あるいは核酸としての試薬・標準品としても利用できる。

10

#### (形質転換体)

本発明は、大腸菌、酵母、枯草菌、昆虫細胞、動物細胞、レトロウィルス等の自体公知の宿主を利用した遺伝子組換え技術によって、本発明からなるペプチドの提供が可能である。本発明のペプチドは、単純蛋白質の状態で細胞傷害性T細胞による認識性が確認されており、蛋白質への糖付加の有無を無視できるため、遺伝子組換え技術による製造方法において宿主の選択は生産性のみを考慮すればよく容易にできる。

形質転換は、自体公知の手段が応用され、例えばレプリコンとして、プラスミド、染色体、ウィルス等を利用して宿主の形質転換が行われる。より好ましい系としては、遺伝子の安定性を考慮するならば、染色体内へのインテグレート法があるが、簡便には核外遺伝子を利用した自律複製系が利用できる。ベクターは、選択した宿主の種類により選別され、発現目的の遺伝子配列と複製そして制御に関する情報を担持した遺伝子配列とを構成要素とする。組合せは原核細胞、真核細胞によって分別され、プロモーター、リボソーム結合部位、ターミネーター、シグナル配列、エンハンサー等を自体公知の方法によって組合せ利用できる。

25

形質転換体は、自体公知の各宿主の培養条件に最適な条件を選択して培養される。培養は、発現産生されるペプチドの生理活性、特に細胞傷害性T細胞による



認識性を指標にしておこなってもよいが、培地中の形質転換体量を指標にして継代培養またはバッチ培養によって生産される。

(化学合成)

- 5     本発明のペプチドは、通常のペプチド化学において知られる方法でも製造できる。例えば、ペプチド合成（丸善）1975年、“Peptide Synthesis, Interscience, New York 1996”が例示されるが、無論既知の方法が広く利用可能である。

10    (ペプチドの回収)

- 本発明のペプチドの回収は、細胞傷害性T細胞による認識性を指標にして、分子篩、イオンカラムクロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等を組合せるか、溶解度差に基づく硫酸、アルコール等の分画手段によっても精製回収できる。より好ましくは、該ペプチドに対する抗体を作成し、ポリクローナル
- 15    抗体またはモノクローナル抗体によって、特異的に吸着回収する方法を用いる。

(抗体)

- 本発明のペプチドを免疫学的に認識する抗体は、自体公知の抗体作製法に従って得ることができる。例えば、本発明のペプチドをアジュバントの存在下または
- 20    非存在下で単独または担体に結合して動物に投与し、体液性応答および／または細胞性応答等の免疫誘導を行うことにより得られる。担体は、それ自体が宿主に対して有害作用をおこさなければ特に限定されず、例えばセルロース、重合アミノ酸、アルブミン等が例示される。免疫される動物は、マウス、ラット、兎、ヤギ、馬等が好適に用いられる。
- 25    ポリクローナル抗体は、本発明のペプチドで免疫された動物の血清から自体公知の抗体回収法、例えば好ましい手段として免疫アフィニティクロマトグラフィー法により得られる。



モノクローナル抗体を生産するためには、上記の免疫手段が施された動物から抗体産生細胞を回収し、自体公知の永久増殖性細胞への形質転換手段を導入することによって行われる。

かくして得られたポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体は、本発明の  
5 ペプチドの精製用抗体、試薬、標識マーカーなどとして利用できる。

#### (スクリーニング)

本発明のペプチド、該ペプチドをコードするポリヌクレオチドおよびその相補鎖、これらのアミノ酸配列および塩基配列の情報に基づき形質転換させた細胞、  
10 または本発明のペプチドを免疫学的に認識する抗体は、単独または複数を組合せることによって細胞傷害性T細胞を誘導または活性化しうる化合物のスクリーニングに有効な手段を提供する。スクリーニング方法は、自体公知の医薬品スクリーニングシステムを利用して構築可能である。本発明は、本発明のスクリーニング方法によって得られる化合物も対象とする。該化合物は、本発明のペプチドの  
15 H L A - A 2 4 0 2 拘束性および／またはH L A - A 2 拘束性のC T Lによる認識性を増強する化合物、本発明のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を増強する化合物、本発明のペプチドと同様に細胞傷害性T細胞を誘導もしくは活性化しうる化合物、また本発明のペプチドによるC T Lの誘導もしくは活性化を増強する化合物などでありうる。

20

#### (医薬組成物)

本発明のペプチド、該ペプチドをコードするポリヌクレオチドおよびその相補鎖、これらのアミノ酸配列および塩基配列の情報に基づき作製したベクター、該ベクターにより形質転換させた細胞、本発明のペプチドを免疫学的に認識する抗  
25 体、本発明のスクリーニング方法によって得られる本発明のペプチドのH L A - A 2 4 0 2 拘束性および／またはH L A - A 2 拘束性のC T Lによる認識性を増強する化合物や本発明のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を増強する化



合物などを、単独または複数組合せて利用することによって、これらの少なくとも1つを含んでなる医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物は癌の治療において有用である。

例えば、本発明のペプチドを含有する医薬組成物は、いわゆる癌ワクチンとして使用される。このとき細胞性免疫の賦活のために、本発明のペプチドは適当なアジュバントの存在または非存在下で、単独で用いるかまたは担体に結合して用いる。担体は、それ自体が人体に対して有害作用をおこさなければ、特に限定されず例えばセルロース、重合アミノ酸、アルブミン等が例示される。剤形は、自体公知のペプチド製剤の手段を応用して適宜選択できる。その投与量は、細胞傷害性T細胞による認識性により変化するが、一般的には活性本体として0.01mg~100mg/日/成人ヒト、好ましくは0.1mg~10mg/日/成人ヒトである。これを数日ないし数月に1回投与する。

または、患者の末梢血より単核球画分を採取し、本発明のペプチドとともに培養し、CTLが誘導された該単核球画分を患者の血液中に戻すことによって、有効な癌ワクチン効果を得ることができる。培養するときの単核球濃度、ペプチドの濃度等の培養条件は、簡単な実験により決定することができる。また、培養時、インターロイキン2などのリンパ球増殖能を有する物質を添加してもよい。

本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドおよびその相補鎖は、癌の遺伝子治療のために有用である。これらDNAをベクターに担持させ、直接体内に導入する方法またはヒトから細胞を採取したのち体外で導入する方法があるが、いずれも利用できる。ベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス等が知られているが、レトロウイルス系が推奨される。無論これらウイルスは複製欠陥性である。その投与量は、細胞傷害性T細胞による認識性により変化するが、一般的には本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチド含量として0.1μg~100mg/日/成人ヒト、好ましくは1μg~50mg/日/成人ヒトである。これを数日ないし数月に1回投与する。



(診断方法および診断用試薬キット)

本発明のペプチドは、該ペプチドの発現に関連した疾患（特に消化器系癌）の診断方法として有用であり、例えば当該ペプチドをコードしている核酸配列との相互作用・反応性を利用して、相応する核酸配列の存在量を決定すること、および／または当該ペプチドについて個体中の生体内分布を決定すること、および／または当該ペプチドの存在、個体由来の試料中の存在量を決定することによって行われる。すなわち、本発明のペプチドを診断マーカーとして検定するのである。その測定法は、自体公知の抗原抗体反応系、酵素反応系、PCR反応系等を利用すればよい。また本発明には、上記診断方法に使用する試薬キットも含まれる。

10 本発明の試薬キットは、少なくとも本発明のペプチド、該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、該ペプチドを認識する抗体のうち1つ以上からなるものである。

実施例

15 以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されるものではない。

実施例 1

(lck遺伝子の同定)

細胞傷害性T細胞を活性化しうる腫瘍抗原を得るために、KE4腫瘍細胞のcDNAライブラリーから作製した合計 $10^5$ 個のcDNAクローンをHLA-A2402と共にトランスフェクションしたVA13細胞を刺激細胞(stimulator)として用い、CTLとともに培養して、CTLを活性化せしめるcDNAクローンを得た。CTLの活性化は、IFN- $\gamma$ の産生を指標にして測定した。この方法により、腫瘍拒絶抗原をコードする遺伝子の同定が可能である(J. Exp. Med. 187:277~288, 1998)。

20  
25

具体的には、エフェクター細胞として用いたCTLは、HLA-A2402拘束性腫瘍特異的細胞傷害性T細胞(KE4-CyT)である。この細胞は、食道



癌患者から樹立した (Int. J. Cancer, 81:457-466, 1999)。また、腫瘍抗原を得るために、KE4腫瘍細胞を用いてそのポリ(A)<sup>+</sup>RNAをcDNAに変換し、これをSalIアダプターと結合して発現ベクターpSV-SPORT-1 (GIBCO BRL) 中に挿入した。HLA-A2402または対照であるHLA-A0201のcDNAを、逆転写PCR (RT-PCR) によって得、そして、真核生物発現ベクターpCR3 (Invitrogen) 中にクローン化した。プラスミドDNAプールまたはKE4 cDNAライブラリーのクローンの200 ngと、HLA-A2402のcDNA 200 ngとを、OPTI-MEM (GIBCO BRL) 70  $\mu$ l 中で、リポフェクチン1  $\mu$ l と、15分間混合した。

混合物の30  $\mu$ l を、ついで、 $2 \times 10^4$ 個のVA13細胞に添加し、5時間インキュベーションした。次に、10%のFCSを含むRPMI-1640培地200  $\mu$ l を加え、2日間培養した。その後、KE4-CTL ( $10^4$ 細胞/ウェル) を添加した。18時間インキュベーション後、上清の100  $\mu$ l を回収し、既に報告した (J. Exp. Med. 187:277-288, 1998) ように、ELISAキットを用いてIFN- $\gamma$ を測定した。

その結果、1つのクローン (クローン21) が、HLA-A24拘束性KE4-CTLを活性化することを見いだした (図1)。このcDNAクローンの塩基配列は1,750塩基 (bp) 長であり、かつ509アミノ酸からなるLck蛋白質のアミノ酸配列のポジション31-506に対応する塩基配列であるポジション283-2,032と100%相同性を有することが判明した。すなわち、Lck遺伝子がコードする蛋白質は、HLA-A2402拘束性にCTLを活性化しうる腫瘍抗原であることが示唆された。

また、HLA-A2402拘束性KE-CTLの代わりに、大腸癌患者より樹立したCTL株 (OK-CTL) の亜株であるOK-CTL-e亜株 (HLA-A0207) (J. Immunol., 163:4999-5004, 1999) ならびに肺癌患者より樹立したCTL株 (GK-CTL) の2つの亜株であるG



K-CTL 2-2-4 亜株 (HLA-A 0206) および GK-CTL 2-2-5 亜株 (HLA-A 0206) の合計 3 つの HLA-A 2 拘束性 CTL をエフェクター細胞として用い、lck 遺伝子と HLA-A 0201、HLA-A 0206、HLA-A 0207、HLA-A 2402、または HLA-A 2601 とを  
5 トランスフェクションした VA 13 細胞を刺激細胞として用いて、Lck 蛋白質が HLA-A 24 拘束性 CTL のみならず、HLA-A 2 拘束性 CTL をも活性化しうる腫瘍抗原であることを見いだした〔図 2 の (A)、(B) および (C)〕。

## 実施例 2

### 10 (Lck 蛋白質の発現)

種々の細胞および組織における蛋白質レベルでの Lck (56 kD および 59 kD) の発現を、抗 Lck モノクローナル抗体を用いてウェスタンブロット分析により検討した。

原発性の結腸癌 (n=49)、非腫瘍性の結腸 (n=5)、肺癌〔腺癌: n=15  
8, 扁平上皮癌 (SCC): n=8〕、食道癌細胞を検討に使用した。さらに、大腸癌細胞株 (COLO 201, COLO 205, COLO 320, HCT 116, および SW 620)、肺癌細胞株 (LK 87: 腺癌細胞、および LK 79: 小細胞癌細胞)、食道癌細胞株 (KE 4) も検討に用いた。

試料は、10 mM の Tris-HCl、pH 7.4、150 mM NaCl、  
20 0.5% Triton X-100、0.2 mM PMSF (Sigma Chemical Co.) と 0.03 トリプシンインヒビター単位/ml のアプロチニンからなる緩衝液で溶解し、超音波処理し、そして 14,000 rpm で 20 分間遠心した。得られた上清を、細胞質 (cytosol) 画分として使用した。溶解物は、10% SDS-PAGE で分離した。

25 アクリルアミドゲル中で得られた蛋白質は、Hybond™-ポリビニリジンジフルオライド膜 (Amersham) に転写 (blot) し、抗 Lck モノクローナル抗体 (Santa Cruz) と室温で 4 時間インキュベーションした。



他の方法は、既報告 (Int. J. Cancer, 54:158-165, 1995) のウエスタンブロット分析に従った。

Lck蛋白質は未刺激の末梢血単核球 (PBMC) では認められなかったが、  
10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のフィトヘマグルチニン (phytohemagglutinin; PHA) で48時間刺激した後の活性化されたPBMC (PHA-blast) の細胞質 (cytosol) 画分には検出されるようになった。Lck蛋白質はSCCまたは腺腫瘍細胞株などの試験した全ての悪性腫瘍細胞株、並びに食道癌、肺SCCおよび肺腺癌細胞などの多種の臓器から得られた新鮮腫瘍組織の大多数で検出された。一方、非腫瘍性の結腸組織のいずれでも全く検出されなかった (表1)。

(以下、余白)

15

20

25



表 1

細胞の種類／由来	Lck蛋白質の発現	
	細胞株	組織
正常細胞		
末梢血単核球	2/2	-
PHA-blast	2/2	-
COS-7/VA13	0/2	-
非癌部大腸組織	-	4/6
非癌部食道組織	-	4/6
非癌部子宮組織	-	4/6
癌細胞		
大腸癌	7/7	38/49
食道癌	6/14	5/9
肺癌	4/17	4/10
胃癌	2/8	ND
子宮癌	5/7	55/64
卵巣癌	0/12	ND
肝細胞癌	0/13	ND
骨肉腫	0/16	ND
原発性脳腫瘍	0/16	5/24
転移性脳腫瘍	-	6/6

ND：未確定

## 実施例 3

- 5 (HLA-A24拘束性CTLにより認識される腫瘍抗原ペプチド)

HLA-A24分子結合性のLck由来の腫瘍抗原ペプチドを特定するために、13個の異なったペプチドを合成してC1R/A2402に導入し、KE4-CTLによるIFN- $\gamma$ 産生を増強する能力について試験した。

- 10 HLA-A2402分子への結合能をもつLck由来ペプチドは、HLA-A24結合モチーフ(motif)に対するペプチドについて文献検索し、13種



の異なるペプチドを、l c k 遺伝子産物の 509 アミノ酸配列 (Nature、319:682~685、1986) に基づいて合成した。但し、一部アミノ酸に変更を加えたものもある。合成したペプチドを表 2 に示す。

5 表 2

L c k ペプチド	アミノ酸配列
39-48	: R N G S E Y R D P L
71-80	: S Y E P S H D G D L
114-122	: N F V A K A N S L
162-170	: S F S L S V R D F
191-199	: F Y I S P R I T F
208-216	: H Y T N A S D G L
303-312	: L Y A V V T Q E P I
317-325	: E Y M E N G S L V
353-361	: A F I E E R N Y I
393-402	: E Y T A R E G A K F
445-453	: T N P E V I Q N L
486-494	: T F D Y L R S V L
488-497	: D Y L R S V L E D F



腫瘍抗原ペプチドの特定のために、HLA-A2402でトランスフェクションしたC1R/A2402細胞の $2 \times 10^4$ 個を、終濃度 $10 \mu\text{M}$ のペプチドと2時間パルスした。ついで、 $1 \times 10^4$ 個のKE4-CTLを加え、18時間インキュベーションした。上清の $100 \mu\text{l}$ を回収し、ELISAによって、IFN- $\gamma$ を測定した。

合成した13個のペプチドのうち、6個のペプチド〔Lck71-80、Lck208-216（配列番号3）、Lck317-325、Lck353-361、Lck486-494（配列番号1）、Lck488-497（配列番号2）〕が、CTLにおけるIFN- $\gamma$ 産生増強活性を有しており（図3）、特に3個のペプチド〔Lck208-216（配列番号3）、Lck486-494（配列番号1）、Lck488-497（配列番号2）〕で強い活性が認められた。Lck486-494（配列番号1）、またはLck488-497（配列番号2）ペプチドの、CTLによるIFN- $\gamma$ 産生を増強する活性は濃度依存的であり、 $1 \text{ nM}$ 程度で認められた。一方、Lck208-216（配列番号3）の活性は $100 \text{ nM}$ 以上で認められた（図4）。

C1R/A2402細胞の代わりにVA13細胞（ $2 \times 10^4$ 個）を用い、HLA-A2402でトランスフェクションしてこれらのペプチドをパルスし、刺激細胞（stimulator）として使用した場合も、同様の結果が得られた。

また、上記のCTL活性化試験において、抗CD3（NuT3）、抗CD4（NuTh/s）、抗CD8（NuTC/i）、抗CD13（MCS-2）、抗MHCクラスI（W6/32）または抗MHCクラスII（HDR1）抗体（Int. J. Cancer, 58:317~323, 1994）を用いたところ、3つの各ペプチドでパルスしたC1R/A2402細胞に対する反応におけるKE4-CTLによるIFN- $\gamma$ 産生は、抗CD3、抗CD8および抗MHCクラスIモノクローナル抗体によって阻害されたが、抗CD4、抗MHCクラスIIおよび抗CD13モノクローナル抗体では阻害されなかった〔図5の（A）、（B）および（C）〕。従って、KE4-CTLは、 $\text{CD}3^+ \text{CD}8^+ \text{CD}4^-$ 表現型を有し、



MHCクラスIを認識する細胞傷害性T細胞であることが確認された。

さらに、CTLにおけるペプチドの特異性を確認するために、KE4-CTLの亜株(subline)を、親株であるHLA-A2402拘束性KE4-CTLから、限界希釈培養(limiting dilution culture)によって、樹立した(J. Exp. Med. 187: 277~288, 1998)。得られたCD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>表現型を有する20の異なったKE4-CTLの細胞亜株(subline)について、上記3個の各ペプチドに対する反応性について試験した。

その結果、2つの亜株(亜株 #49および#93)がLck488-497(配列番号2)を、1つのクローン(クローン #80)がLck486-494(配列番号1)を認識した〔図6の(B)、(C)および(D)〕。亜株 #19はLck208-216(配列番号3)およびLck486-494(配列番号1)の両方と反応した〔図6の(A)〕。他の16の亜株はこれらのペプチドのいずれとも反応しなかった。このことから、CTLは複数の腫瘍抗原を認識する細胞の集団であることが示唆される。

#### 実施例4

(ペプチドによるHLA-A24拘束性細胞傷害性T細胞の誘導)

3個のペプチド〔(Lck208-216(配列番号3)、Lck486-494(配列番号1)、Lck488-497(配列番号2))〕について、大腸癌患者から得たPBMCから、Lck蛋白質を発現している腫瘍細胞株(KE4、SW620およびCOLO201)に対するHLA-A24拘束性CTLを誘導する活性を試験した。

HLA-A24<sup>+</sup>患者または健常人のPBMCの $2 \times 10^6$ 個を、培養培地(45%RPMI-1640培地、45%AIM-V<sup>®</sup>培地/GIBCO BRL、およびIL-2の100U/mlと0.1mMのMEMノンエッセンシャルアミノ酸溶液/GIBCO BRLを含む10%FCS)2mlを含む24ウェルブ



レート各ウエル中で、ペプチド  $10 \mu\text{M}$  とインキュベーションした。

培養7日目および14日目にこの細胞を回収して洗浄し、放射線照射（50グレイ）した自己PBMCまたは樹状細胞をペプチドでパルスしたものを抗原提示細胞（APC）として用いて刺激した。この樹状細胞は、10% FCSと100  
 5  $\text{U/ml}$  のIL-4と100  $\text{U/ml}$  のGM-CSF（顆粒球・マクロファージーコロニー刺激因子）を含むRPMI 1640（GIBCO BRL）中で、PBMC（ $2 \times 10^6$  細胞/ウエル）を7日間インキュベーションすることにより誘導した。

培養21日目に採取した細胞をエフェクターとし、直ちに種々のターゲット（標  
 10 的細胞）に対する反応性を、IFN- $\gamma$ の産生能を指標としてELISA法により測定した。その結果を図7に示す。Lck208-216（配列番号3）、Lck486-494（配列番号1）、Lck488-497（配列番号2）を用いてin vitroで3回刺激したPBMC、特にLck486-494（配  
 15 列番号1）、Lck488-497（配列番号2）で刺激したPBMCは、HLA-A24<sup>-</sup>腫瘍細胞（COLO201）に対する反応より、HLA-A24<sup>+</sup>腫瘍細胞（KE4およびSW620）に対する反応において、より多くのIFN- $\gamma$ を産生した。一方、健常人から得たPBMCは、抗原提示細胞（APC）として放射線照射したPBMCを用いてパルスした3個のペプチドのいずれを用いて刺激しても、HLA-A24拘束性のCTL活性は示さなかった。健常人から得  
 20 られたPBMCはペプチドをパルスした樹状細胞（Dendritic Cell；DC）をAPCとして用いて刺激したときにはHLA-A24拘束性のCTL活性を示した（表3）。

（以下、余白）



表 3

ドナー	抗原提示細胞	ペプチド	癌細胞株の認識による インターフェロン- $\gamma$ 産生量 (pg/ml)		
			KE4 (A24 <sup>+</sup> )	SW620 (A24 <sup>+</sup> )	COL0201 (A24 <sup>-</sup> )
大腸癌患者	自己末梢血単核	なし	1079	902	194
		Lck208-216	1479	1113	188
		Lck486-494	1857	1724	289
		Lck488-497	2527	2140	424
健常ドナー 1	自己樹状細胞	なし	230	380	54
		Lck208-216	570	786	124
		Lck486-494	1105	2061	177
		Lck488-497	621	966	122
健常ドナー 2	自己末梢血単核	なし	101	187	0
		Lck208-216	82	128	1
		Lck486-494	41	94	10
		Lck488-497	90	140	6

また、標的細胞からの<sup>51</sup>Cr遊離試験のために、ペプチドを用いて3回刺激した上記PBMCを、相当するペプチドで予めパルス処理した放射線処理HLA-A24<sup>+</sup>異種PBMC(2×10<sup>5</sup>細胞/ウェル)からなるフィーダー細胞と共にさらに培養した。再培養の約24日目に、これら細胞の細胞傷害性T細胞活性をIFN- $\gamma$ 産生量の測定により確認し、さらにこれら細胞について6時間の<sup>51</sup>Cr遊離試験をエフェクター/ターゲット(標的細胞)の比率を変えて行い、細胞傷害性を直接的に検討した。上記3つのLck由来のペプチドで刺激したPBMCは、HLA-A24<sup>+</sup>KE腫瘍細胞およびSW620腫瘍細胞を溶解したが、健常人からのHLA-A24<sup>+</sup>PHA活性化T細胞またはHLA-A24<sup>-</sup>CO



LO201腫瘍細胞を溶解しなかった。Lck488-497を用いた結果を図8の(A)に、Lck208-216を用いた結果を図8の(B)に示す。従って、Lck由来のペプチドはHLA-A24拘束性の腫瘍特異的細胞傷害性T細胞を誘導しうることが明らかとなった。

5

#### 実施例5

(癌患者から得た末梢血単核球におけるHLA-A24拘束性CTLの誘導)

3個のペプチド〔Lck208-216(配列番号3)、Lck486-494(配列番号1)、Lck488-497(配列番号2)〕について、癌患者から得たPBMCから、Lck蛋白質を発現した腫瘍細胞株(KE4、SW620およびCOLO201)に対するHLA-A24拘束性CTLを誘導する活性を、IFN- $\gamma$ 産生量を指標に測定した。CTLの誘導方法、およびIFN- $\gamma$ 測定方法は実施例4と同様の方法を用いた。

その結果、表4に示すように、大腸癌患者および食道癌患者のPBMCから、Lck208-216(配列番号3)、Lck488-497(配列番号2)によりCTLが誘導された。

表4

症例	年齢	性別	癌種	転移の有無	LckペプチドによるCTL誘導			
					ペプチド (-)	Lck208-216	Lck486-494	Lck488-497
N.I.	51	男性	大腸癌	+	-	+	-	+
Y.K.	73	女性	食道癌	+	試験せず	+	-	+

次に、該大腸癌患者のPBMC( $2 \times 10^6$ 個)を予め、3個のペプチド、Lck208-216(配列番号3)、Lck486-494(配列番号1)、Lck488-497(配列番号2)を加えて刺激し、その後、抗原提示細胞とし

20



て各ペプチドを  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  加えてインキュベーションした  $\text{HLA-A24}^+$   
 $\text{C1R}/\text{A2402}$  細胞に加えてさらに培養し、培養上清中に産生された  $\text{IFN-}\gamma$   
 量を測定した。図9の(A)、(B)、(C)および(D)に示すように、  
 予め、 $\text{Lck486-494}$  (配列番号1) または  $\text{Lck488-497}$  (配列  
 5 番号2) で刺激した大腸癌患者のPBMCは、抗原提示細胞に提示されたペプチ  
 ド、それぞれ  $\text{Lck486-494}$  (配列番号1) または  $\text{Lck488-497}$   
 (配列番号2) にのみ反応して  $\text{IFN-}\gamma$  産生、すなわちCTLを誘導した。つ  
 まり、 $\text{Lck486-494}$  (配列番号1) または  $\text{Lck488-497}$  (配列  
 番号2) は大腸癌患者のPBMCから、予備刺激することによりペプチド特異的  
 10 なCTLを誘導しうるということが判明した。一方、 $\text{Lck208-216}$  (配列番号  
 3) またはペプチド非存在下で大腸癌患者のPBMCを予め刺激した場合は、ペ  
 プチド特異的なCTLは誘導できなかった。

次に、該大腸癌患者から誘導されたCTLの性状を検討するために、標的細胞  
 としてSW620細胞を用い、抗CD4 (NuTh/s)、抗CD8 (NuTC  
 15 /i)、抗CD14、抗MHCクラスI (W6/32) または抗MHCクラスII  
 (HDR1) 抗体をそれぞれ  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $\text{Lck488-497}$  (配列番号  
 2) を  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  加え、さらに上記大腸癌患者から誘導されたCTLを加え  
 て、インキュベーションし、上清中に産生される  $\text{IFN-}\gamma$  量を測定した (図1  
 0)。その結果、CTLからの  $\text{IFN-}\gamma$  産生は抗CD8および抗MHCクラス  
 20 Iモノクローナル抗体によって阻害された。すなわち、大腸癌患者から誘導され  
 たCTLは、 $\text{CD8}^+\text{CD4}^-$  表現型を有しMHCクラスIを認識する細胞傷害性  
 T細胞であることが確認された。

上記大腸癌患者のPBMC中のCTL前駆細胞について検討を行った。96ウ  
 エルプレートにSW620細胞を播いてインキュベーションし、予め  $\text{Lck48}$   
 25  $\text{8-497}$  (配列番号2) で刺激した上記大腸癌患者のCTLを1個~100個  
 /ウェルとなるよう加えてさらに培養し、標的細胞であるSW620細胞の生存  
 するウェルを確認した。対照として、ペプチドで刺激しない上記大腸癌患者のC



TLを用いた。結果は図11に示す。大腸癌患者のPBMC中のCTL前駆細胞の頻度は、ペプチドで刺激しないときは1/634であるが、Lck488-497（配列番号2）で刺激すると1/81となる。すなわち、ペプチドで刺激することにより、CTL前駆細胞が増加することが認められた。

5

#### 実施例6

（HLA-A24拘束性CTL誘導性を有するペプチドの検討）

以上のように、Lck由来の3個のペプチドLck208-216（配列番号3）（HYTNASDGL）Lck486-494（配列番号1）（TFDYLRSVL）およびLck488-497（配列番号2）（DYLRSVLEDF）がHLA-A24<sup>+</sup>腫瘍細胞株を認識するCTLを誘導することができることを見いだした。これらの結果から、2個のペプチドLck486-494（配列番号1）およびLck488-497（配列番号2）の重なる領域である一定のアミノ酸DYLRSVを、ペプチドで誘導されたCTLが腫瘍抗原エピトープとして認識すること、およびLck蛋白質においてキナーゼドメインに含まれるこの部位が腫瘍拒絶に対する意義を有することが示唆される。このアミノ酸配列DYLRSVに着目し、この配列に相同性をもつペプチドを検索したところ、表5に示す様に、Lckと同じSrcファミリーに属するチロシンキナーゼ（Ann. Rev. Biochem. 54:897-930, 1985）に、相同性を有するアミノ酸配列をもつものがあることが判明した。

（以下、余白）



表 5

Lck	486-498	:	T	F	D	Y	L	R	S	V	L	E	D	F	F
Src	511-523	:	T	F	E	Y	L	Q	A	F	L	E	D	Y	F
Yes	508-520	:	T	F	E	Y	I	Q	S	F	L	E	D	Y	F
Fgr	504-516	:	T	F	E	Y	L	Q	S	F	L	E	D	F	F
Fyn	512-524	:	T	F	E	Y	L	Q	S	F	L	E	D	Y	F
Lyn	489-501	:	T	F	D	Y	L	Q	S	V	L	D	D	F	Y
Hck	503-515	:	T	F	E	Y	I	Q	S	V	L	D	D	F	Y
Blk	482-494	:	T	F	E	F	L	Q	S	V	L	E	D	F	Y

これら Src ファミリー由来のペプチドのアミノ酸配列に基づいて、Src 511-519 (配列番号4: TFEYLQAF L)、Yes 508-516 (配列番号5: TFEYIQSFL)、Fyn 512-520 (配列番号6: TFEYLQSFL)、Lyn 489-497 (配列番号7: TFDYLQSVL)、Hck 503-511 (配列番号8: TFEYIQSVL)、Blk 482-490 (配列番号9: TFEFLQSVL) を合成し、各  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  を標的細胞としての SW620 細胞とともにインキュベーションし、さらに実施例1および実施例2で用いた KE4-CTL 細胞を加えて培養し、培養上清中に産生された IFN- $\gamma$  量を指標として CTL 誘導活性を調べた。また、陽性コントロールとして標的細胞に KE4 を使用した。その他の方法は実施例4と同様の方法を用



いた。図12に示すように、各Srcファミリー由来のペプチドは、Lck由来のペプチドと同様、あるいはそれ以上のCTL誘導能を示した。

#### 実施例7

##### 5 (癌患者におけるSrcファミリー由来のペプチドによるCTLの誘導)

Lck486-494 (配列番号1: TFDYLRSVL)、Src511-519 (配列番号4: TFEYLQAFI)、Yes508-516 (配列番号5: TFEYIQSFI)、Fyn512-520 (配列番号6: TFEYLQSFI)、Lyn489-497 (配列番号7: TFDYLQSVL)、Hck503-511 (配列番号8: TFEYIQSVL)、Blk482-490 (配列番号9: TFEFLQSVL) について、転移性癌患者より得たPBMCからHLA-A24拘束性CTLを誘導しうるか検討した。CTLの誘導方法およびCTLの活性測定法は実施例4と同様の方法により行い、標的細胞としては、KE4細胞 (HLA-A2402/26)、SW620細胞 (HLA-A0201/24)、COLO201細胞 (HLA-A0101/0201)、VA13細胞 (HLA-A02) を用いた。Lck486-494 (配列番号1) は癌患者7例中4例、Src511-519 (配列番号4) は3例中2例、Yes508-516 (配列番号5) は3例中1例、Fyn512-520 (配列番号6) は2例中1例、Hck503-511 (配列番号8) は2例中2例、Blk482-490 (配列番号9) は2例中1例において、PBMC中にCTLを誘導した。しかし、Lyn489-497は検討した2例いずれにおいてもCTLは誘導しなかった。

#### 実施例8

##### 25 (HLA-A2拘束性CTLにより認識される腫瘍抗原ペプチド)

HLA-A2分子結合性のLck由来の腫瘍抗原ペプチドを特定するために、24個の異なったペプチドを合成してVA13 (HLA-A02) に導入し、O



K-CTLまたはGK-CTL亜株(2-2-4)によるIFN- $\gamma$ 産生を増強する能力について実施例3と同様の方法で試験した。

HLA-A2分子への結合能をもつLck由来ペプチドは、HLA-A2結合モチーフ(motif)に対するペプチドについて文献検索し、24種の異なる  
5 ペプチドを、lck遺伝子産物の509アミノ酸配列(Nature、319: 682~685、1986)に基づいて合成した。合成したペプチドを表6および表7に示す。

(以下、余白)

10

15

20

25



表 6

L c k 由来ペプチドのHLA-A0201結合モチーフ

340-348	:	K	L	L	D	M	A	A	Q	I	
185-193	:	N	L	D	N	G	G	F	Y	I	
36-44	:	L	L	I	R	N	G	S	E	V	
387-395	:	R	L	I	E	D	N	E	Y	T	
347-355	:	Q	I	A	E	G	M	A	F	I	
492-500	:	S	V	L	E	D	F	F	T	A	
299-307	:	R	L	V	R	L	Y	A	V	V	
493-501	:	V	L	E	D	F	F	T	A	T	
246-254	:	K	L	V	E	R	L	G	A	A	
279-287	:	S	M	S	P	D	A	F	L	A	
293-301	:	K	Q	L	Q	H	Q	R	L	V	
151-159	:	F	L	I	R	E	S	E	S	T	
35-44	:	R	L	L	I	R	N	G	S	E	V
201-210	:	G	L	H	E	L	V	R	H	Y	T
231-240	:	K	P	W	W	E	D	E	W	E	V
379-388	:	K	I	A	D	F	G	L	A	R	L
294-303	:	Q	L	Q	H	Q	R	L	V	R	L
335-344	:	K	L	T	T	N	K	L	L	D	M
110-119	:	F	I	P	F	N	F	V	A	K	A
250-259	:	R	L	G	A	A	Q	F	G	E	V



表 7

L c k 由来ペプチドの H L A - A 0 2 0 6 結合モチーフ

61-69	:	L	Q	D	N	L	V	I	A	L	
239-247	:	E	V	P	R	E	T	L	K	L	
422-430	:	D	V	W	S	F	G	I	L	L	
27-36	:	I	V	R	L	D	G	K	D	R	L

- 5 腫瘍抗原ペプチドの特定のために、H L A - A 2 でトランスフェクションした V A 1 3 細胞の  $2 \times 10^4$  個を、終濃度  $10 \mu\text{M}$  のペプチドと 2 時間パルスした。ついで、 $1 \times 10^4$  個の K E 4 - C T L を加え、18 時間インキュベーションした。上清の  $100 \mu\text{l}$  を回収し、E L I S A によって、I F N -  $\gamma$  を測定した。
- これらのペプチドのうち、7 個のペプチド〔L c k 6 1 - 6 9 (配列番号 1 1)、
- 10 L c k 2 4 6 - 2 5 4 (配列番号 1 2)、L c k 2 9 4 - 3 0 3 (配列番号 1 3)、L c k 3 4 0 - 3 4 8 (配列番号 1 4)、L c k 3 4 7 - 3 5 5 (配列番号 1 5)、L c k 4 2 2 - 4 3 0 (配列番号 1 6)、L c k 4 9 2 - 5 0 0 (配列番号 1 7)〕が O K - C T L 亜株および G K - C T L 亜株 (2 - 2 - 4) の I F N -  $\gamma$  産生を増強した〔図 1 3 の (A) および (B)〕。また、パルスするペプチドの濃度を
- 15 変化させて同様の実験を行ったところ、L c k 6 1 - 6 9 (配列番号 1 1) は特に O K - C T L 亜株を、L c k 2 4 6 - 2 5 4 (配列番号 1 2) は特に G K - C T L 亜株 (2 - 2 - 4) を、また L c k 4 2 2 - 4 3 0 (配列番号 1 6) は特に G K - C T L 亜株 (2 - 2 - 5) を、濃度依存的に活性化し、これら C T L からの I F N -  $\gamma$  産生を増強した〔図 1 4 の (A)、(B)、および (C)〕。

20

## 実施例 9

(ペプチドによる H L A - A 2 拘束性細胞傷害性 T 細胞の誘導)



3個のペプチド〔(L c k 6 1 - 6 9 (配列番号 1 1)、L c k 2 4 6 - 2 5  
4 (配列番号 1 2)、L c k 4 2 2 - 4 3 0 (配列番号 1 6))〕について、転移  
を有する大腸癌患者から得たP B M Cから、腫瘍細胞株P a n c - 1、S W 6 2  
0、C O L O 3 2 0およびV A 1 3に対するH L A - A 2拘束性C T Lを誘導す  
る活性について試験した。

転移を有するH L A - A 2<sup>+</sup>大腸癌患者のP B M Cを用い、実施例 4 と同様の  
方法でC T Lの誘導およびI F N -  $\gamma$ の測定を行った〔図 1 5 の(A)および(C)〕。  
またC T Lの細胞傷害活性を<sup>51</sup>C r 遊離試験により直接的に測定した〔図 1 5 の  
(B) および (D) 〕。L c k 2 4 6 - 2 5 4 (配列番号 1 2) およびL c k 4  
2 2 - 4 3 0 (配列番号 1 6) は、転移を有するH L A - A 2<sup>+</sup>大腸癌患者から  
のP B M Cから、H L A - A 2拘束性腫瘍特異的C T Lを誘導した。

#### 実施例 1 0

(癌患者におけるH L A - A 2拘束性C T Lの誘導)

3個のペプチド〔(L c k 6 1 - 6 9 (配列番号 1 1)、L c k 2 4 6 - 2 5  
4 (配列番号 1 2)、L c k 4 2 2 - 4 3 0 (配列番号 1 6))〕について、種々  
の癌患者から得たP B M Cから、H L A - A 2拘束性C T Lを誘導しうるか検討  
した。C T Lの誘導方法およびC T Lの活性測定法は実施例 4 と同様の方法によ  
り行い、標的細胞としては、S W 6 2 0細胞(H L A - A 0 2 0 1 / 2 4)を用  
いた。L c k 2 4 6 - 2 5 4 (配列番号 1 2) は癌患者 6 例中 2 例、L c k 4 2  
2 - 4 3 0 (配列番号 1 6) は 6 例中 3 例において、P B M C中にC T Lを誘導  
した(表 8)。

(以下、余白)



表 8

症 例	年 齢	性 別	癌 種	ス テ ー ジ	転 移	LckペプチドによるCTL誘導			
						ペプチ ドなし	Lck246-254	Lck61-69	Lck422-430
1	53	女性	大腸癌	IV	+	-	+	-	-
2	72	女性	大腸癌	IV	+	-	+	-	+
3	57	女性	大腸癌	IIIa	+	-	-	-	-
4	76	男性	肺癌	III	+	-	-	-	+
5	50	男性	食道癌	IV	+	-	-	-	+
6	73	男性	胃癌	I	-	-	-	-	-



## 産業上の利用の可能性

本発明の L c k 由来のペプチドおよび S r c ファミリー由来のペプチドは、腫瘍抗原ペプチドであり、癌患者の P B M C から H L A - A 2 4 拘束性および／または H L A - A 2 拘束性の腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞を誘導することができる。

- 5 L c k 蛋白質は大腸、肺および食道を含む大多数の癌組織で発現している。すなわち、本発明の腫瘍抗原ペプチドは、癌を対象とする特異的免疫治療に用いることができる。また、H L A - A 2 4 対立遺伝子 ( a l l e l e ) は、日本人の人口の約 6 0 % (多くはその 9 5 % の遺伝型が A 2 4 0 2 である)、コーカサス人の 2 0 %、アフリカ人の 1 2 % でみられる。H L A - A 2 対立遺伝子は、日本人
- 10 の約 4 0 %、中国人の 5 3 %、北コーカサス人の 4 9 %、南コーカサス人の 3 8 %、黒人アフリカ人の 2 3 % においてみられる。従って、本発明の腫瘍抗原ペプチドを使用する特異的免疫療法は、多数の癌患者に適用しうる。本発明により提供されるペプチド、これをコードするポリヌクレオチド、これを認識する抗体は、癌の治療および診断の分野で、極めて有用な手段を提供するものである。



## 配列表フリーテキスト

配列番号 10 :

&lt;220&gt;

- 5 <230> S r cファミリーチロシンキナーゼのアミノ酸配列に基づいて作製した、  
H L A - 2 4 拘束性細胞傷害性 T 細胞を誘導する能力を有するペプチド。

&lt;222&gt; (3)

&lt;230&gt; Xaaは、AspまたはGluでありうる。

&lt;222&gt; (4)

- 10 <230> Xaaは、TyrまたはPheでありうる。

&lt;222&gt; (5)

&lt;230&gt; Xaaは、LeuまたはIleでありうる。

&lt;222&gt; (6)

&lt;230&gt; Xaaは、ArgまたはGlnでありうる。

- 15 <222> (7)

&lt;230&gt; Xaaは、SerまたはAlaでありうる。

&lt;222&gt; (8)

&lt;230&gt; Xaaは、ValまたはPheでありうる。

&lt;222&gt; (10)

- 20 <230> Xaaは、GluまたはAspでありうる。

&lt;222&gt; (12)



<230> Xaaは、PheまたはTyrでありうる。

<222> (13)

<230> Xaaは、PheまたはTyrでありうる。



## 請求の範囲

1. 配列表の配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、  
配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 11、配列番  
5 号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、また  
は配列番号 17 に記載のアミノ酸配列からなるペプチド。

2. 下記の式で表される配列表の配列番号 10 に記載のアミノ酸配列からなるペ  
プチド；

Thr-Phe-Xaa-Xbb-Xcc-Xdd-Xee-Xff-Leu-Xgg-Asp-Xhh-Xii

10           ここで、Xaaは、AspまたはGlu、  
Xbbは、TyrまたはPhe、  
Xccは、LeuまたはIle、  
Xddは、ArgまたはGln、  
Xeeは、SerまたはAla、  
15           Xffは、ValまたはPhe、  
Xggは、GluまたはAsp、  
Xhhは、PheまたはTyr、  
Xiiは、PheまたはTyrである。

3. 少なくとも請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載のペプチドからなる細胞傷  
20           害性 T 細胞の誘導剤。

4. 請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載のペプチドを用いることを特徴とする  
細胞傷害性 T 細胞の誘導方法。

5. 少なくとも請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載のペプチドからなる癌ワク  
チン。

25   6. 請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載のペプチドをコードするポリヌクレオ  
チドまたはその相補鎖。

7. 請求の範囲第 6 項に記載のポリヌクレオチドまたはその相補鎖とストリンジ



ェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチド。

8. 請求の範囲第6項または第7項に記載のポリヌクレオチドまたはその相補鎖を含有する組換えベクター。

9. 請求の範囲第8項に記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

5 10. 請求の範囲第9項に記載の形質転換体を培養する工程を含むペプチドの製造方法。

11. 請求の範囲第1項または第2項に記載のペプチドを免疫学的に認識する抗体。

10 12. 請求の範囲第1項または第2項に記載のペプチドと相互作用して、少なくともHLA-A2402拘束性および／またはHLA-A2拘束性の細胞傷害性T細胞による認識性を増強する化合物、および／または請求の範囲第6項もしくは第7項に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を増強する化合物のスクリーニング方法であって、請求の範囲第1項もしくは第2項に記載のペプチド、請求の範囲第6項もしくは第7項に記載のポリヌクレ  
15 オチド、請求の範囲第8項に記載の組換えベクター、請求の範囲第9項に記載の形質転換体、または請求の範囲第11項に記載の抗体のうちの少なくとも1つを用いることを特徴とするスクリーニング方法。

13. 請求の範囲第12項に記載のスクリーニング方法で得られた化合物。

14. 請求の範囲第1項もしくは第2項に記載のペプチド、請求の範囲第6項もしくは第7項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第8項に記載の組換え  
20 ベクター、請求の範囲第9項に記載の形質転換体、請求の範囲第11項に記載の抗体、または請求の範囲第13項に記載の化合物のうちの少なくとも1つを癌治療有効量を含んでなる、癌治療に用いる医薬組成物。

15. 請求の範囲第3項に記載の細胞傷害性T細胞の誘導剤、請求の範囲第5項  
25 に記載の癌ワクチン、または請求の範囲第14項に記載の医薬組成物を癌疾患に用いることを特徴とする治療方法。

16. 請求の範囲第1項または第2項に記載のペプチドの発現または活性に関連



した疾病の診断方法であって、（a）該ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド、および／または（b）個体由来の試料中の該ペプチドをマーカーとして分析することを含む方法。

- 5 17. 請求の範囲第16項に記載の方法に使用する試薬キットであって、少なくとも請求の範囲第1項または第2項に記載のペプチド、請求の範囲第6項または第7項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第11項に記載の抗体のうちの1つ以上からなる試薬キット。



## 要約書

- HLA-A24拘束性および／またはHLA-A2拘束性の腫瘍特異的細胞傷害性T細胞を誘導および／または活性化しうる腫瘍抗原ペプチドを見だし、該
- 5 ペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖、このポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、組み換えベクターを含む形質転換体、ペプチドの製造方法、ペプチドに対する抗体、これらに対して相互作用を有する化合物およびそのスクリーニング方法、これらを利用する医薬組成物、およびこれらを利用する診断手段を提供する。



## 図面

図1

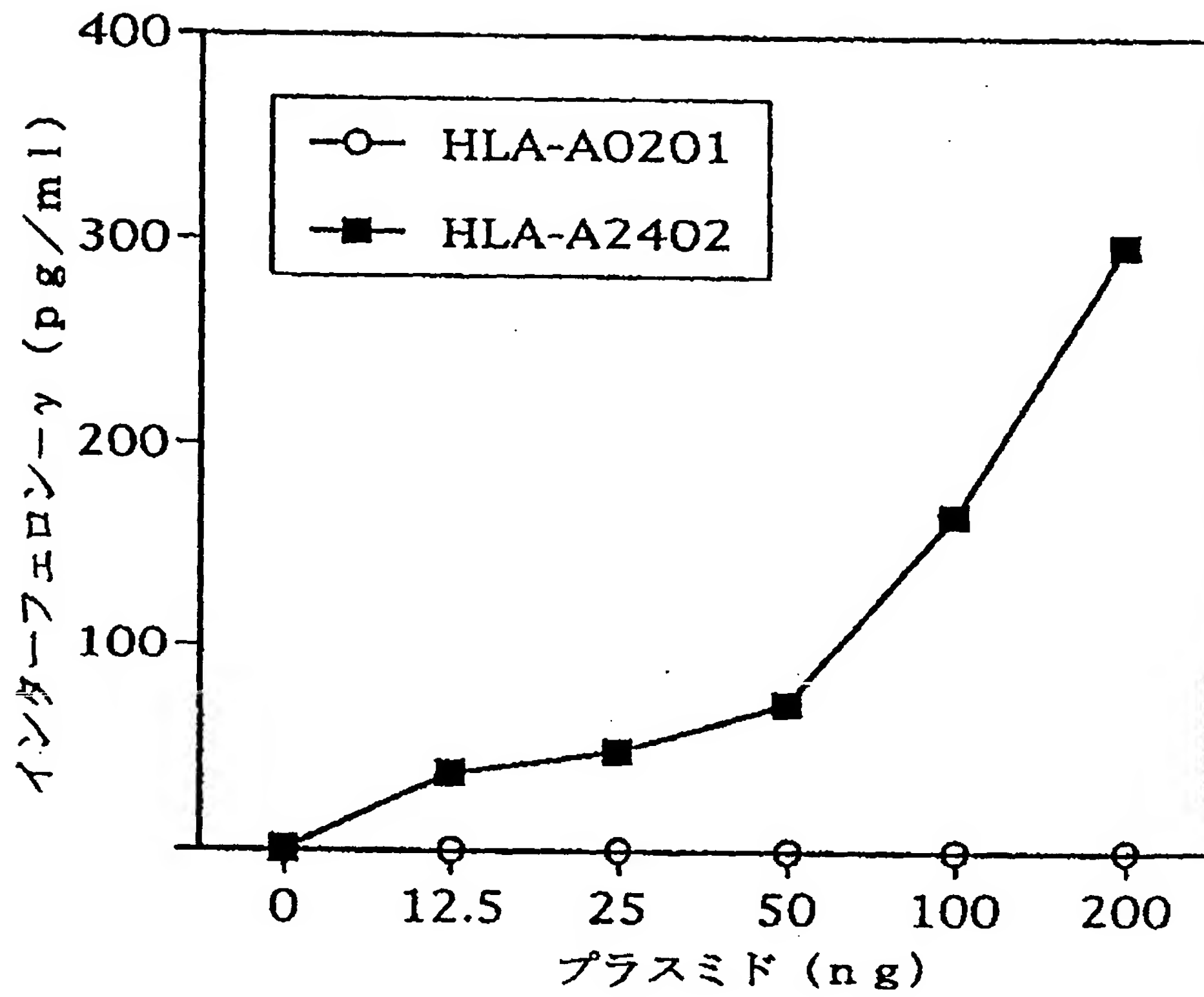




図 2

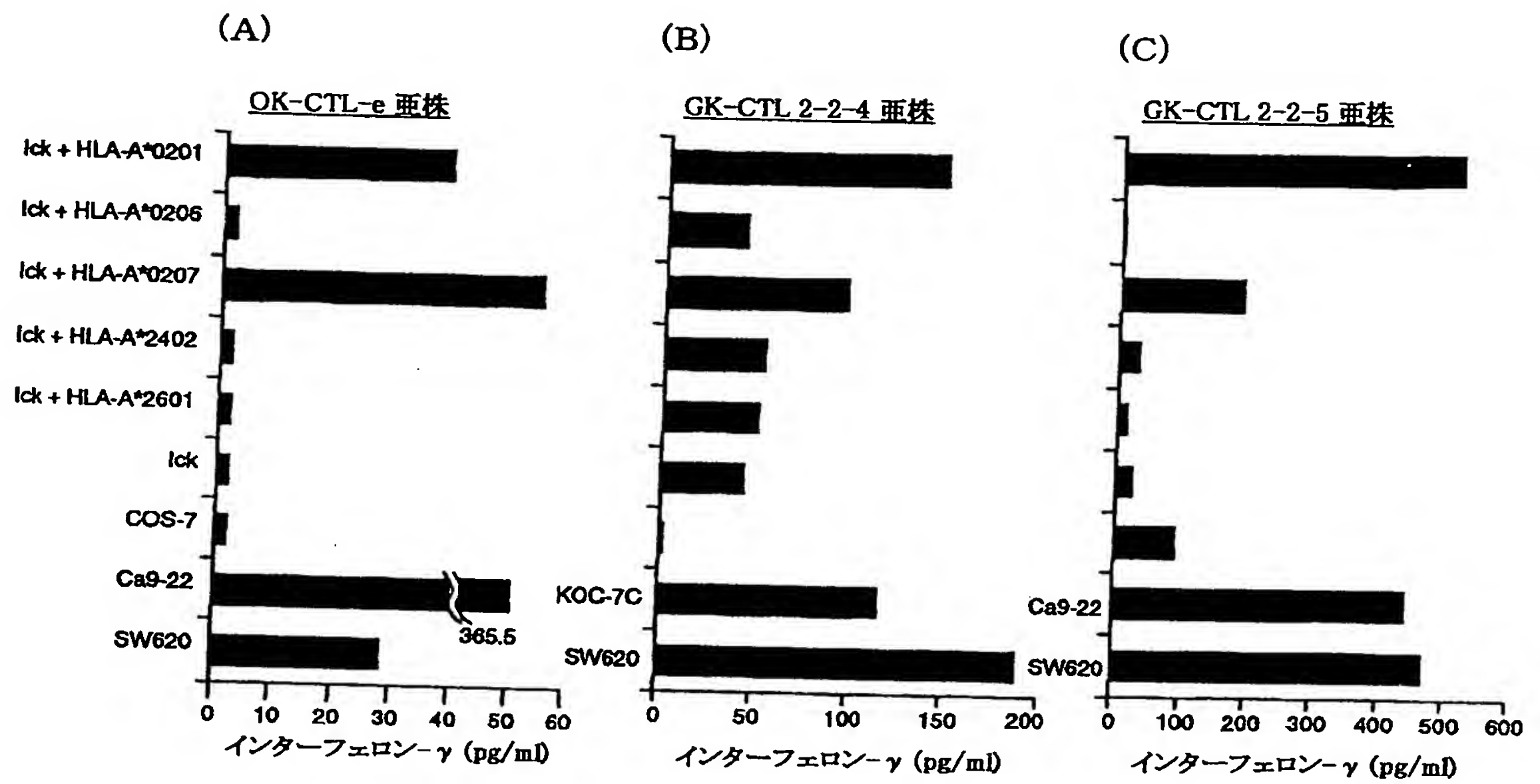


図 3

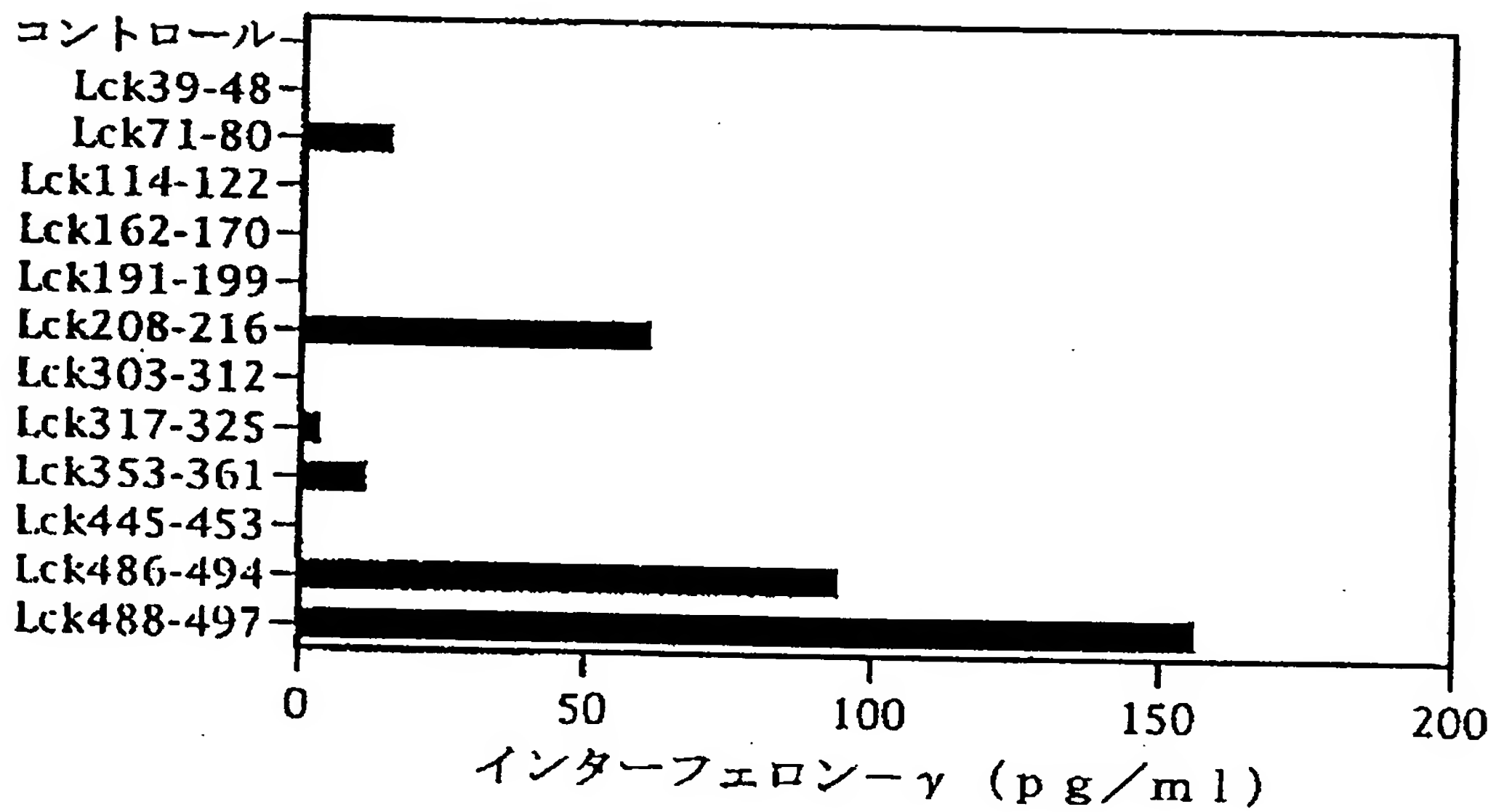




図 4

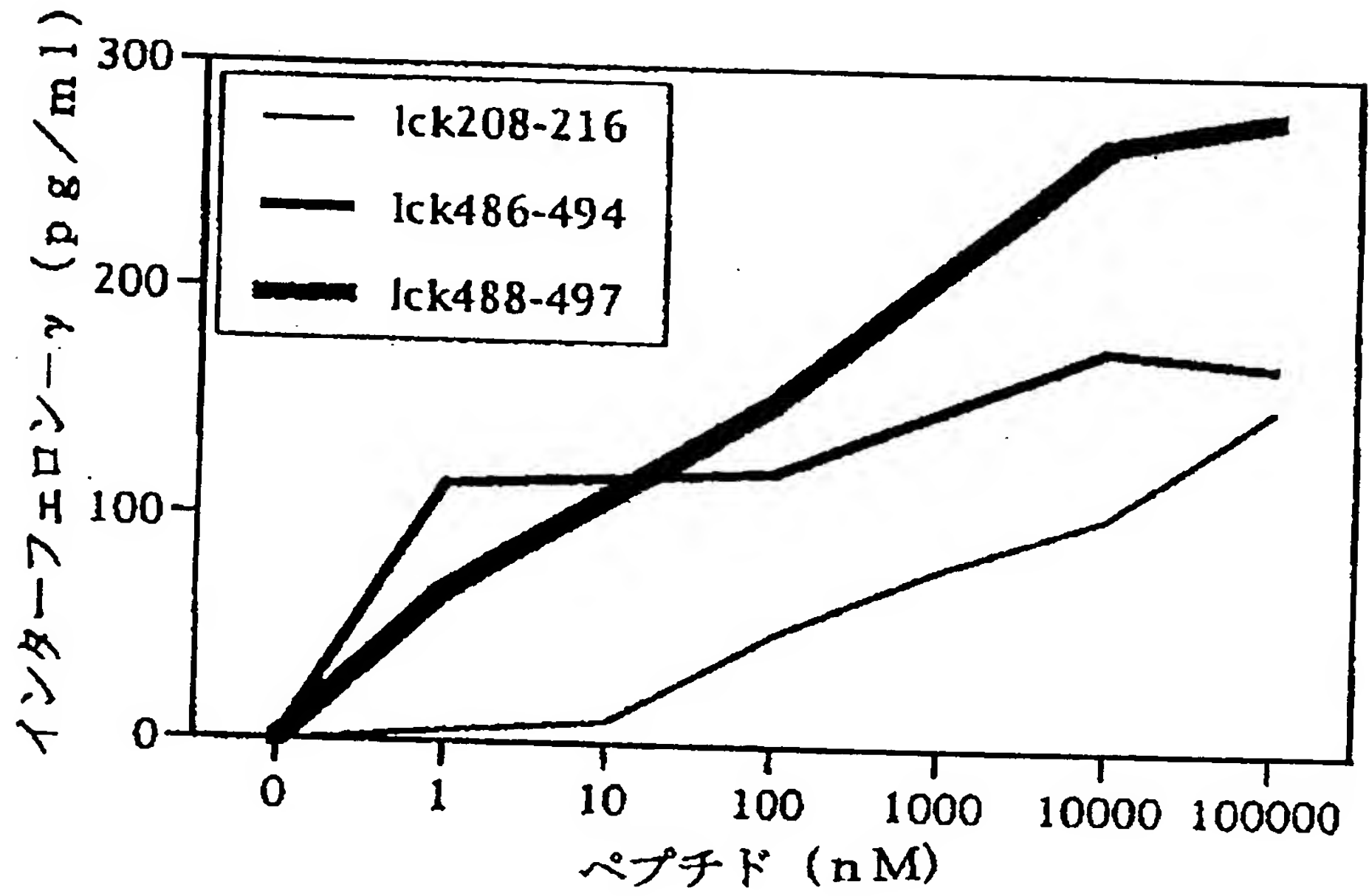


図 5

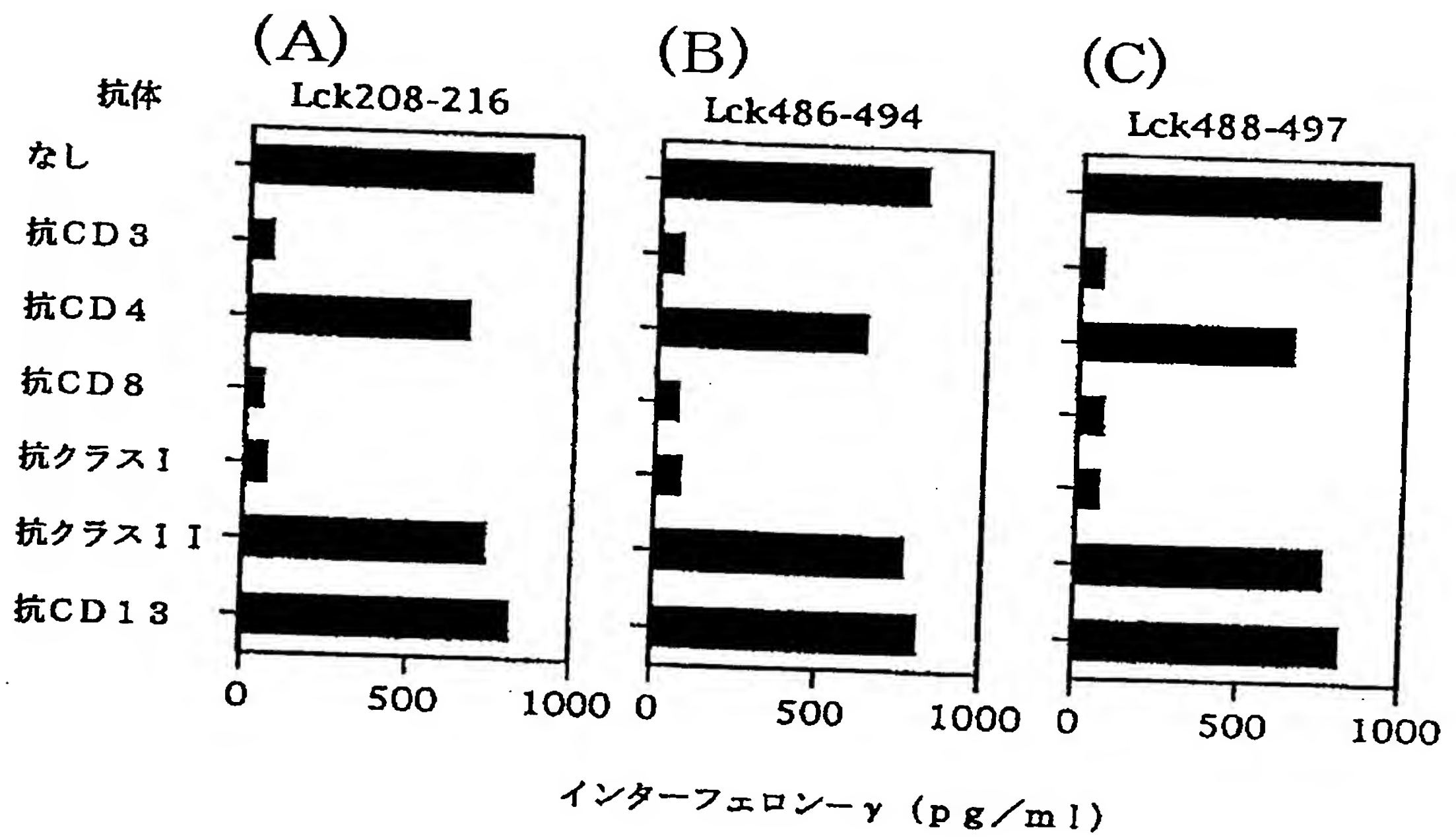




図6

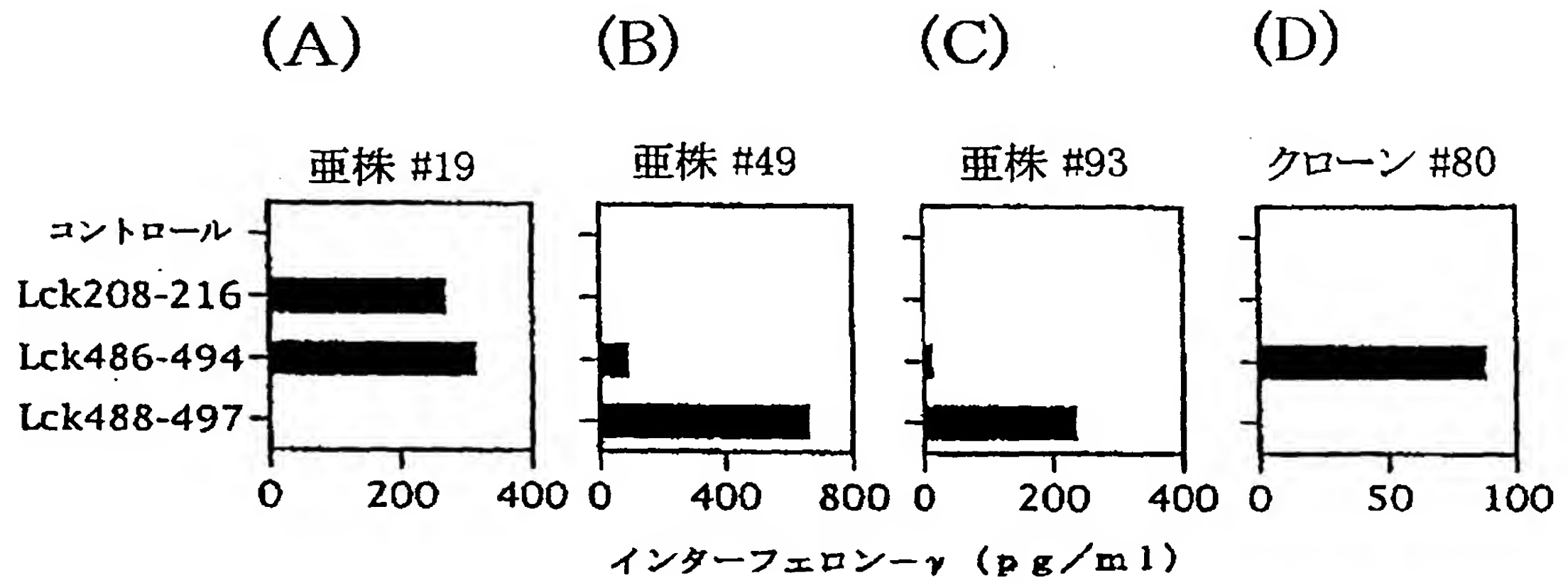


図7

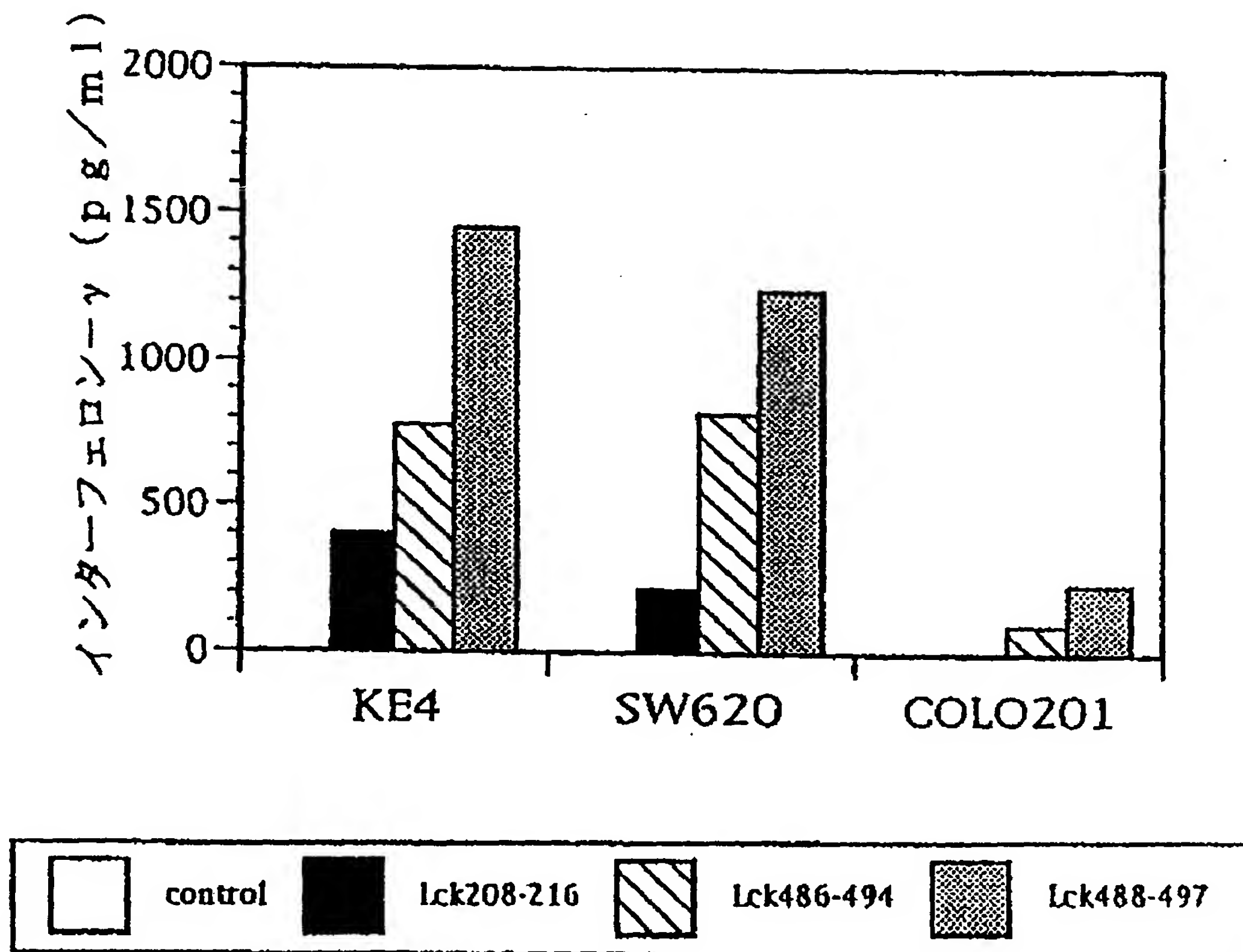
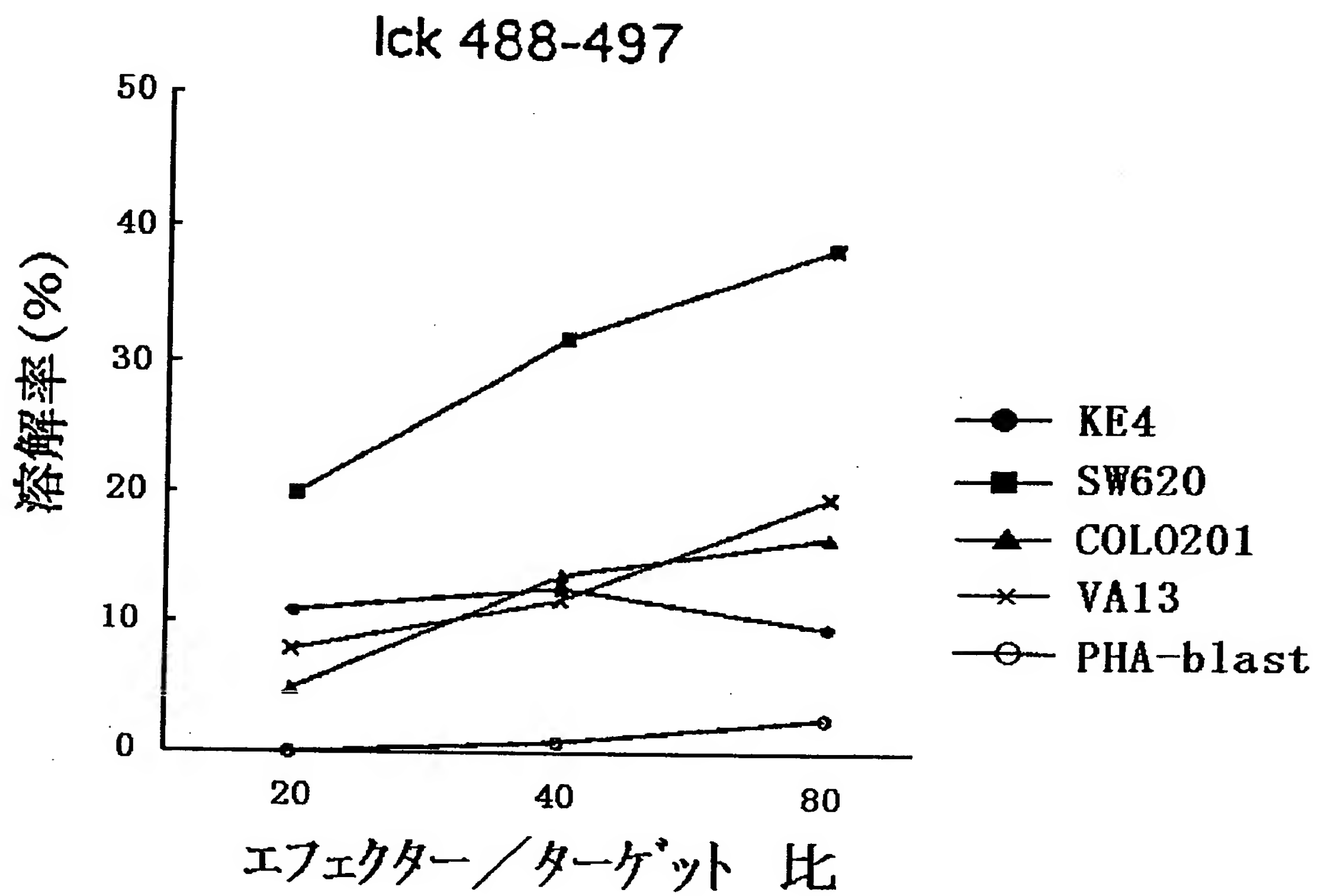




図 8

(A)





(B)

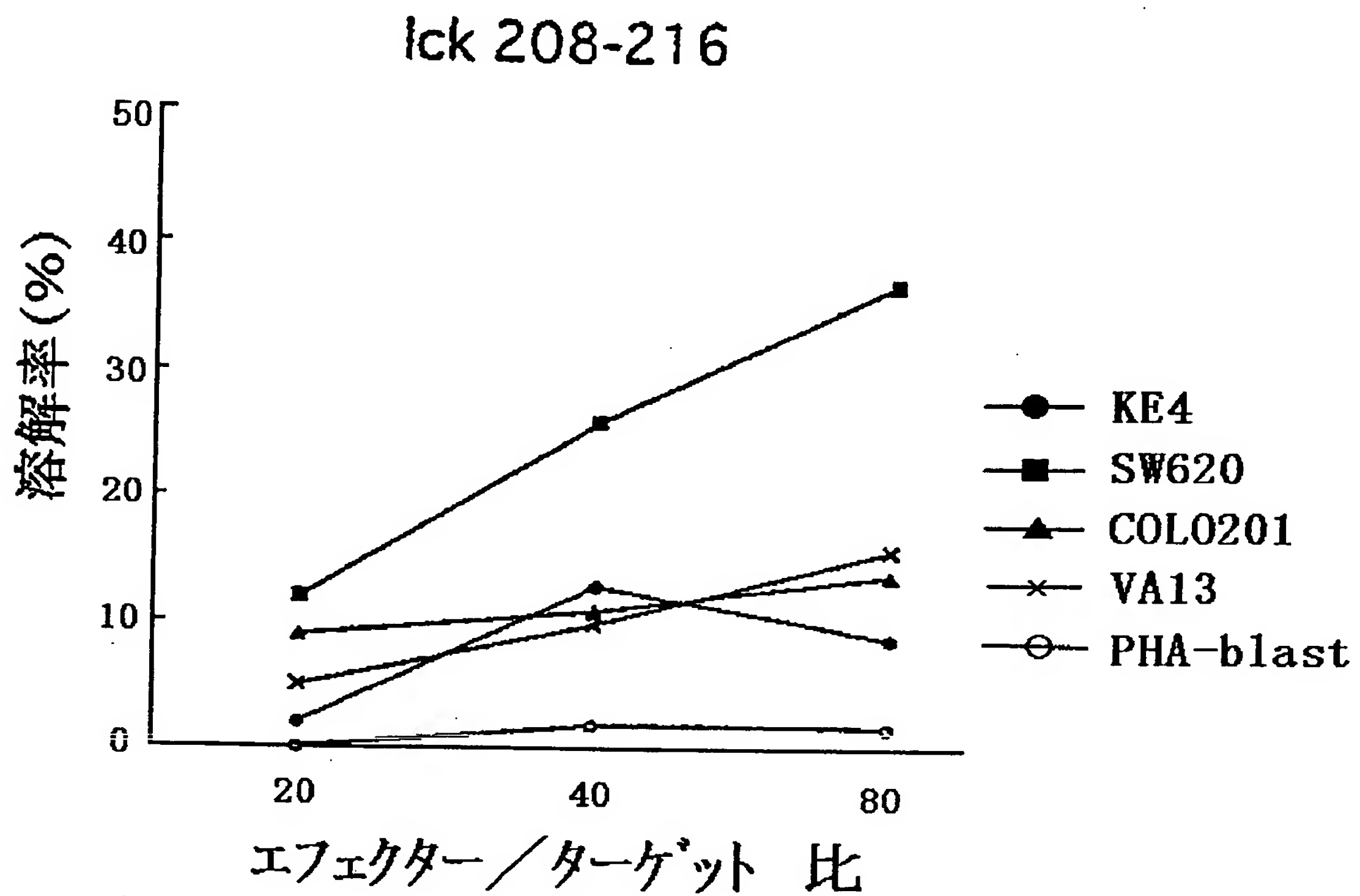
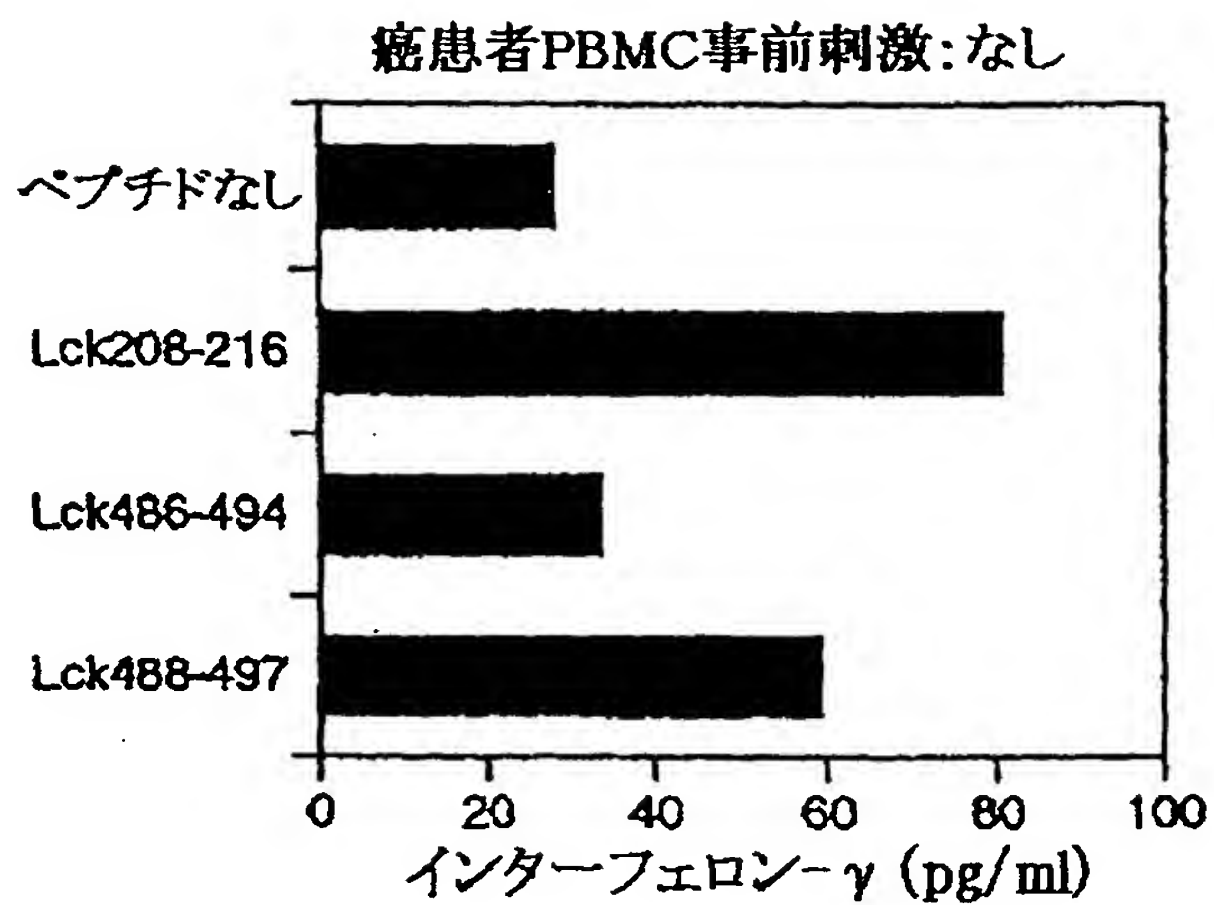


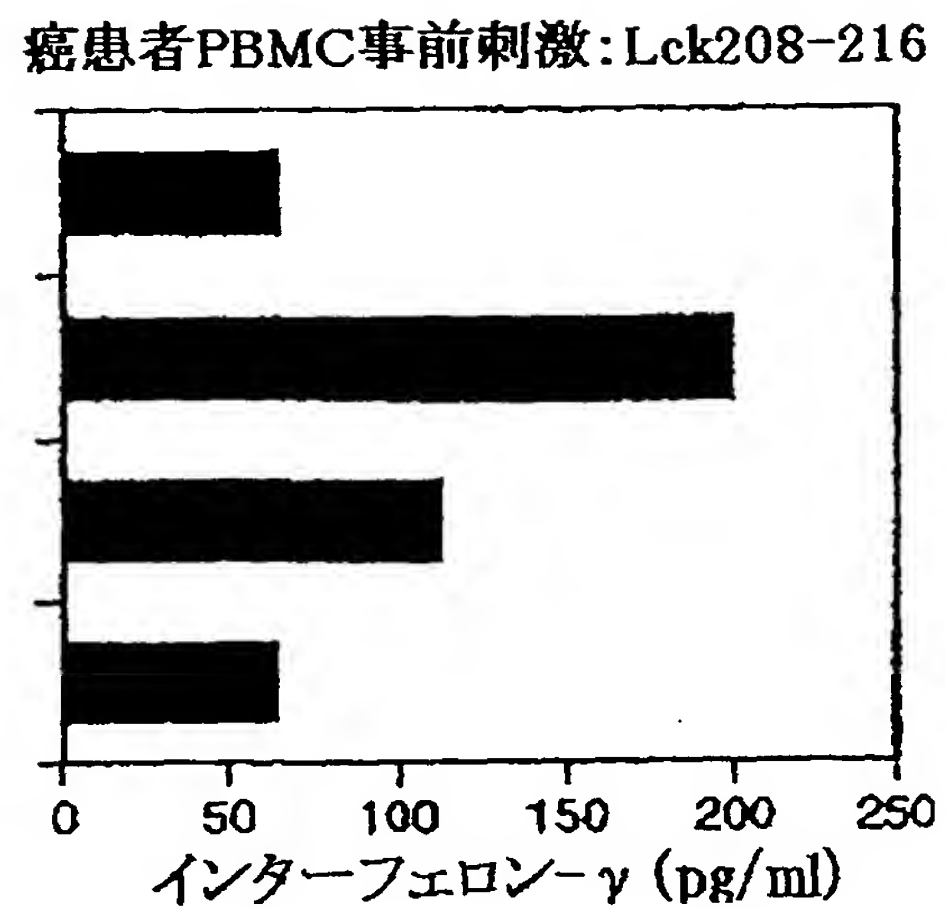


図9

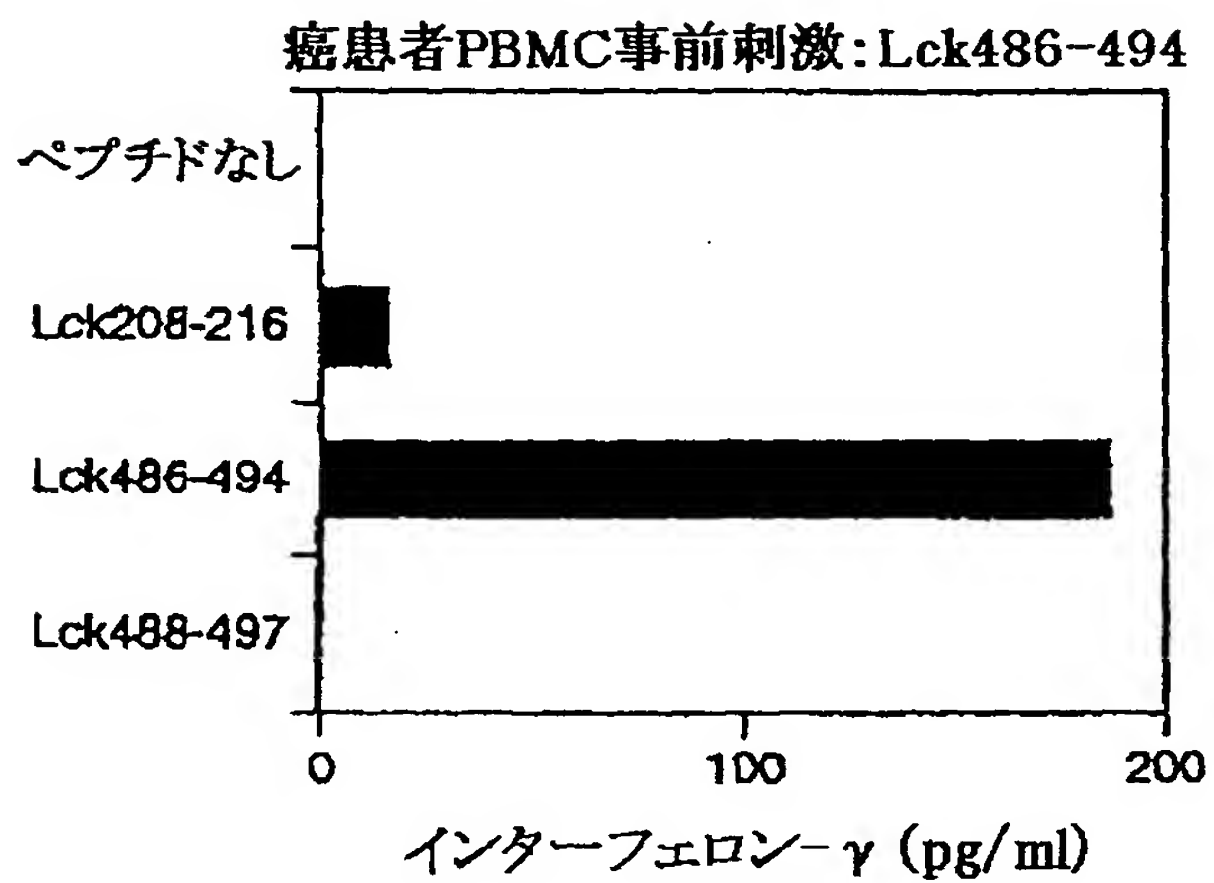
(A)



(B)



(C)



(D)

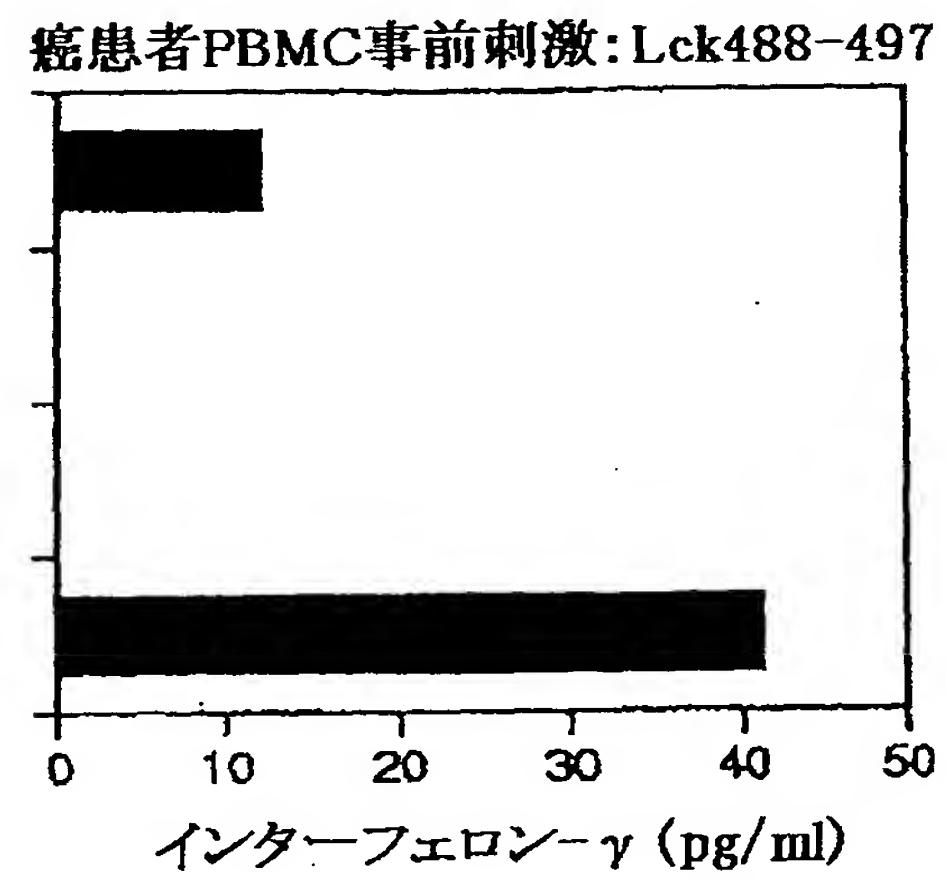




図10

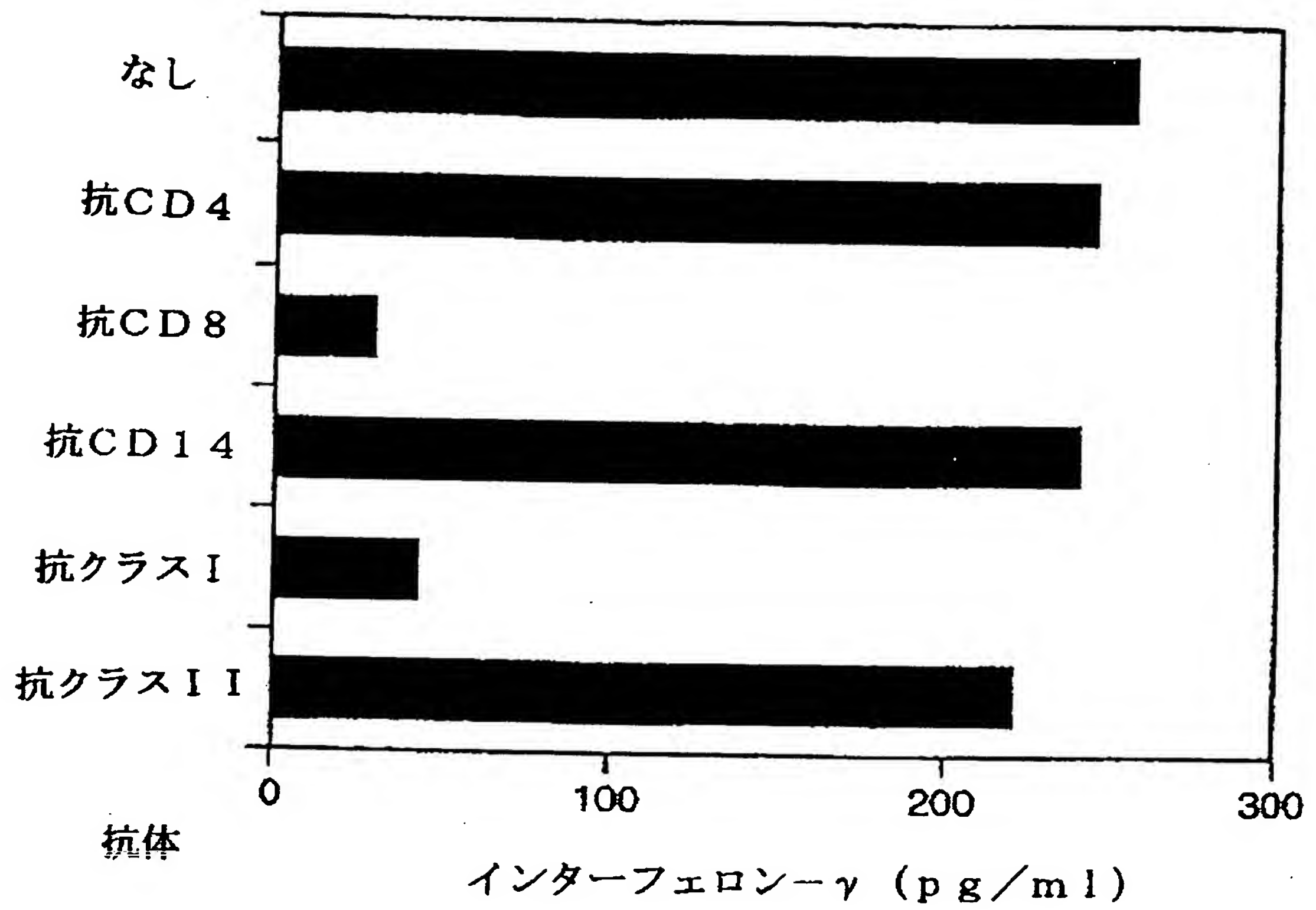




図 1 1

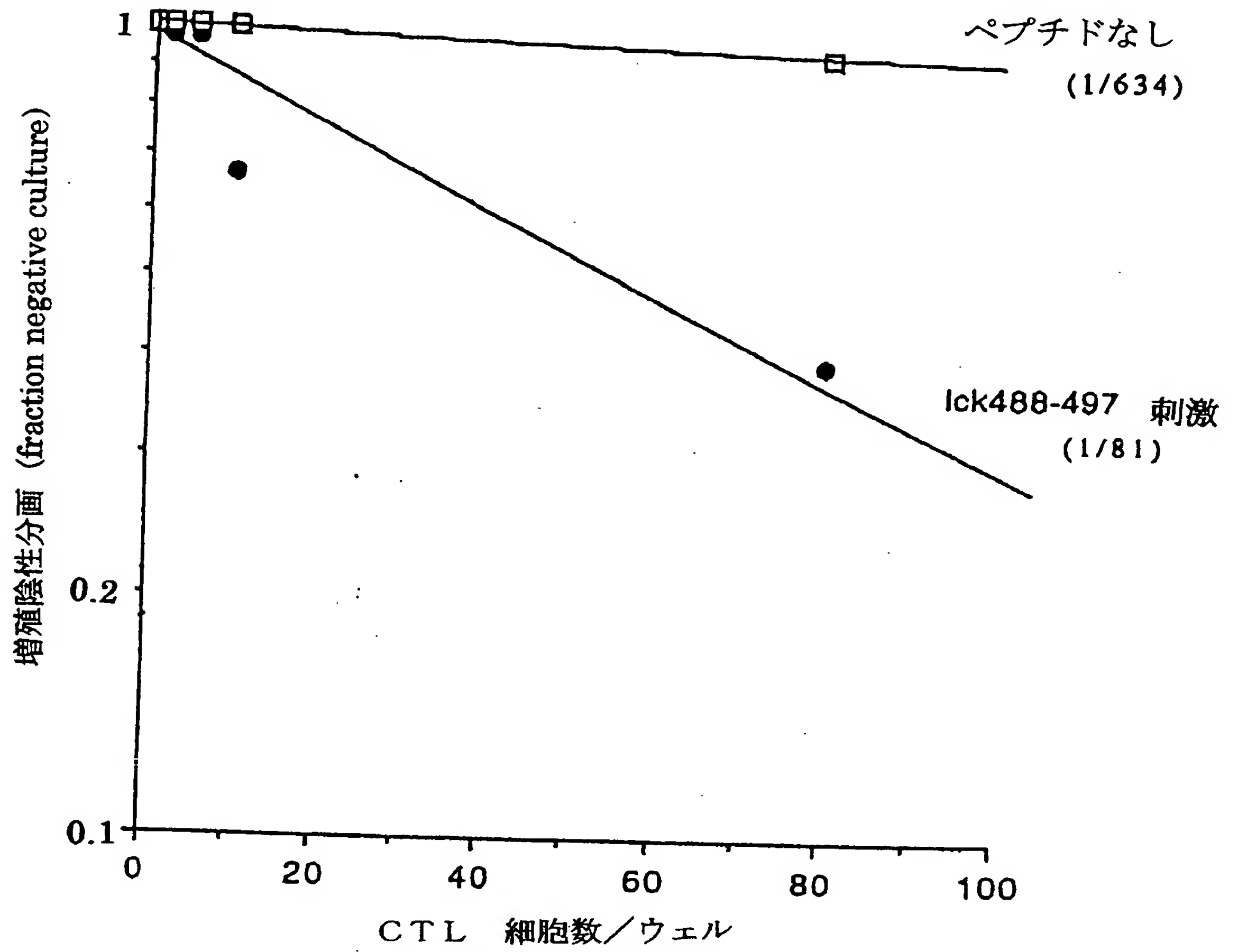




図 1 2

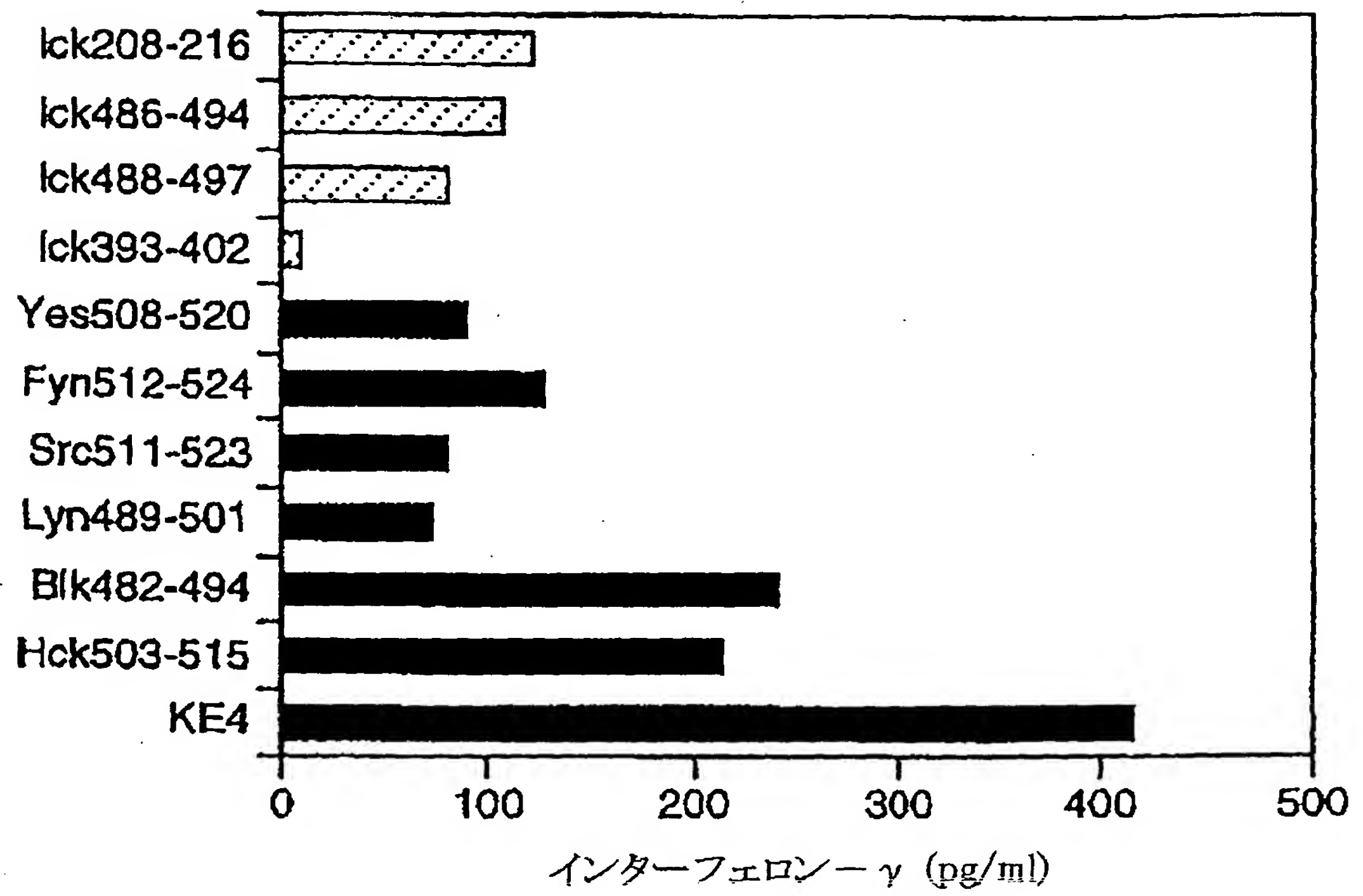




図 1 3

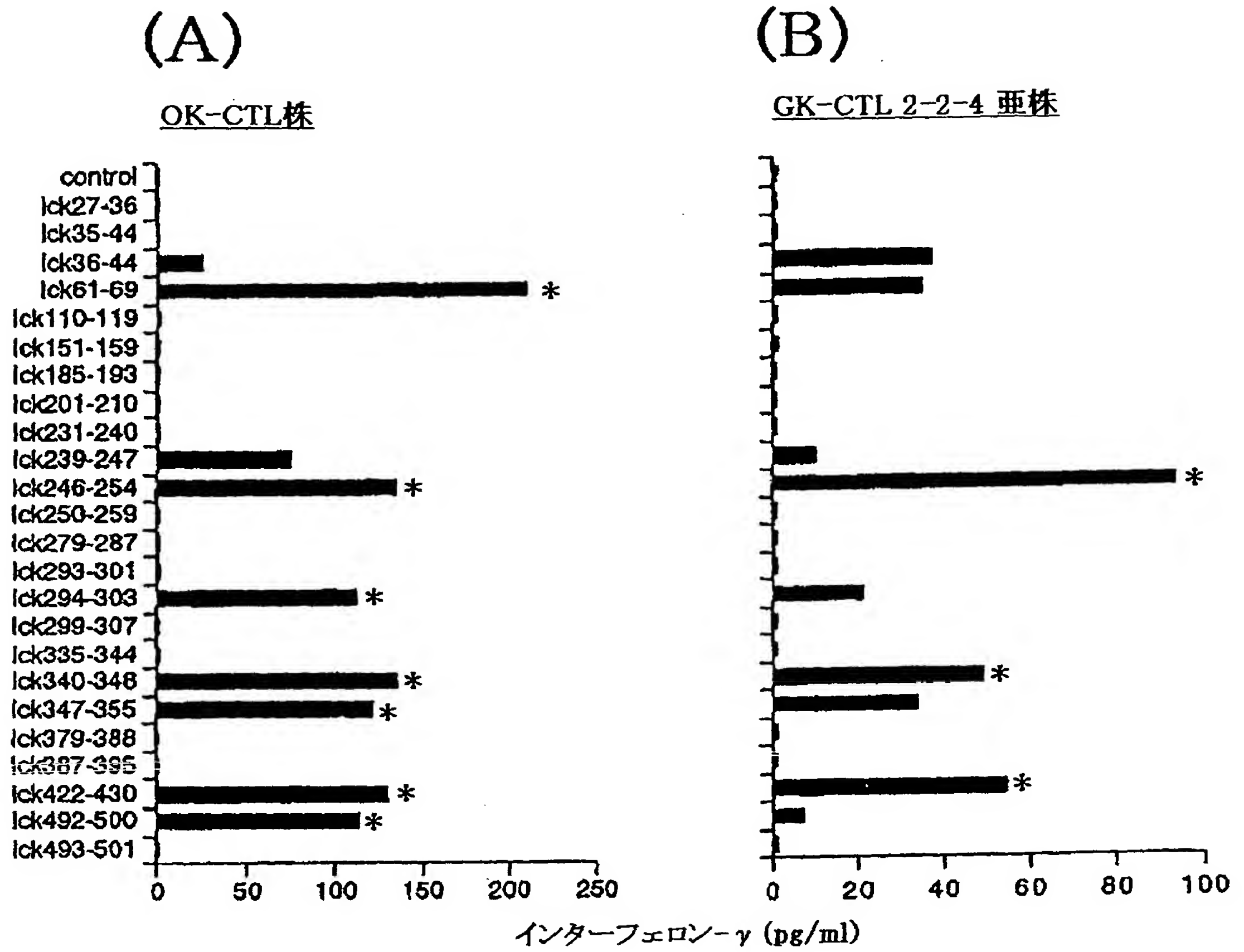
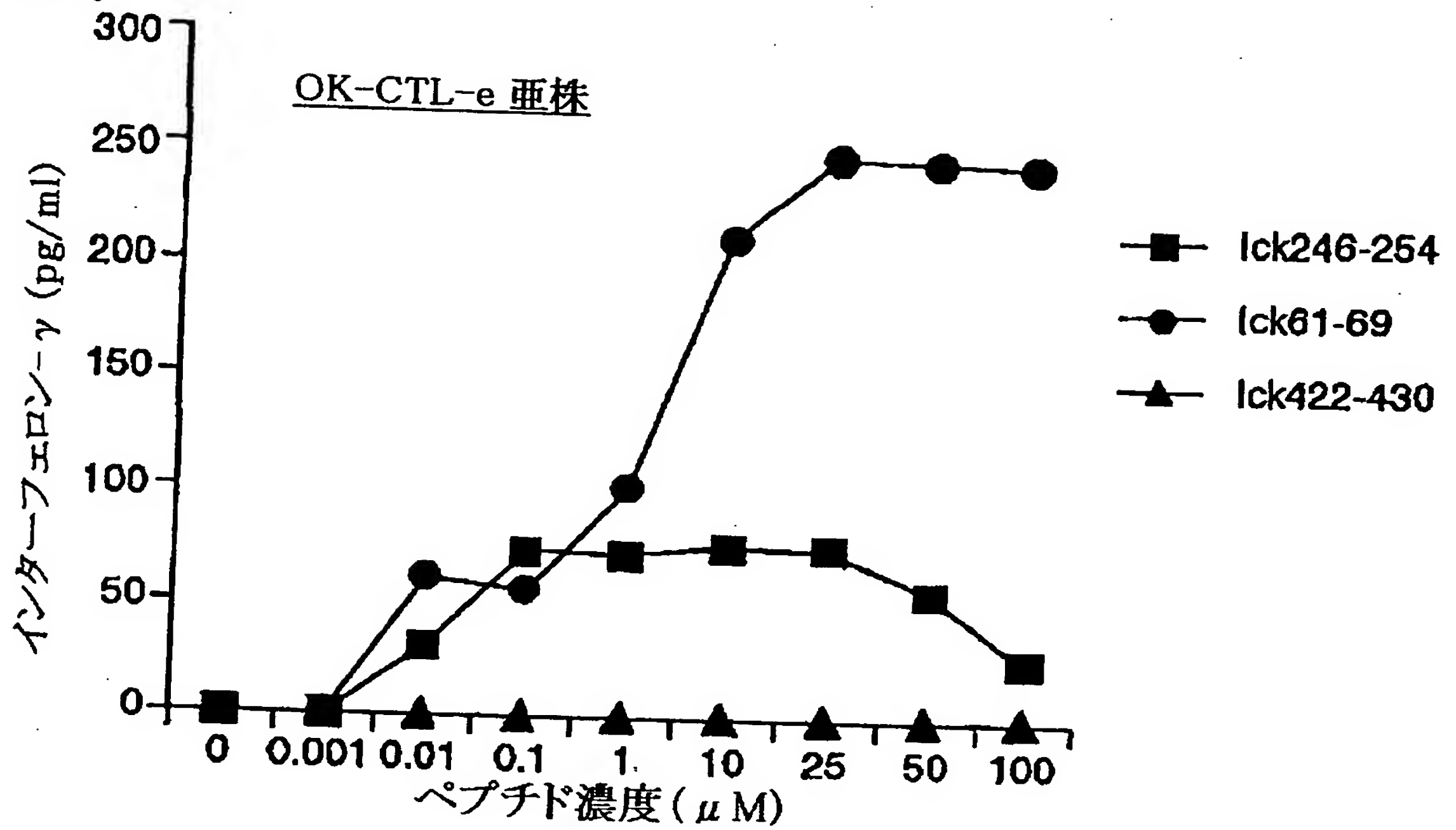


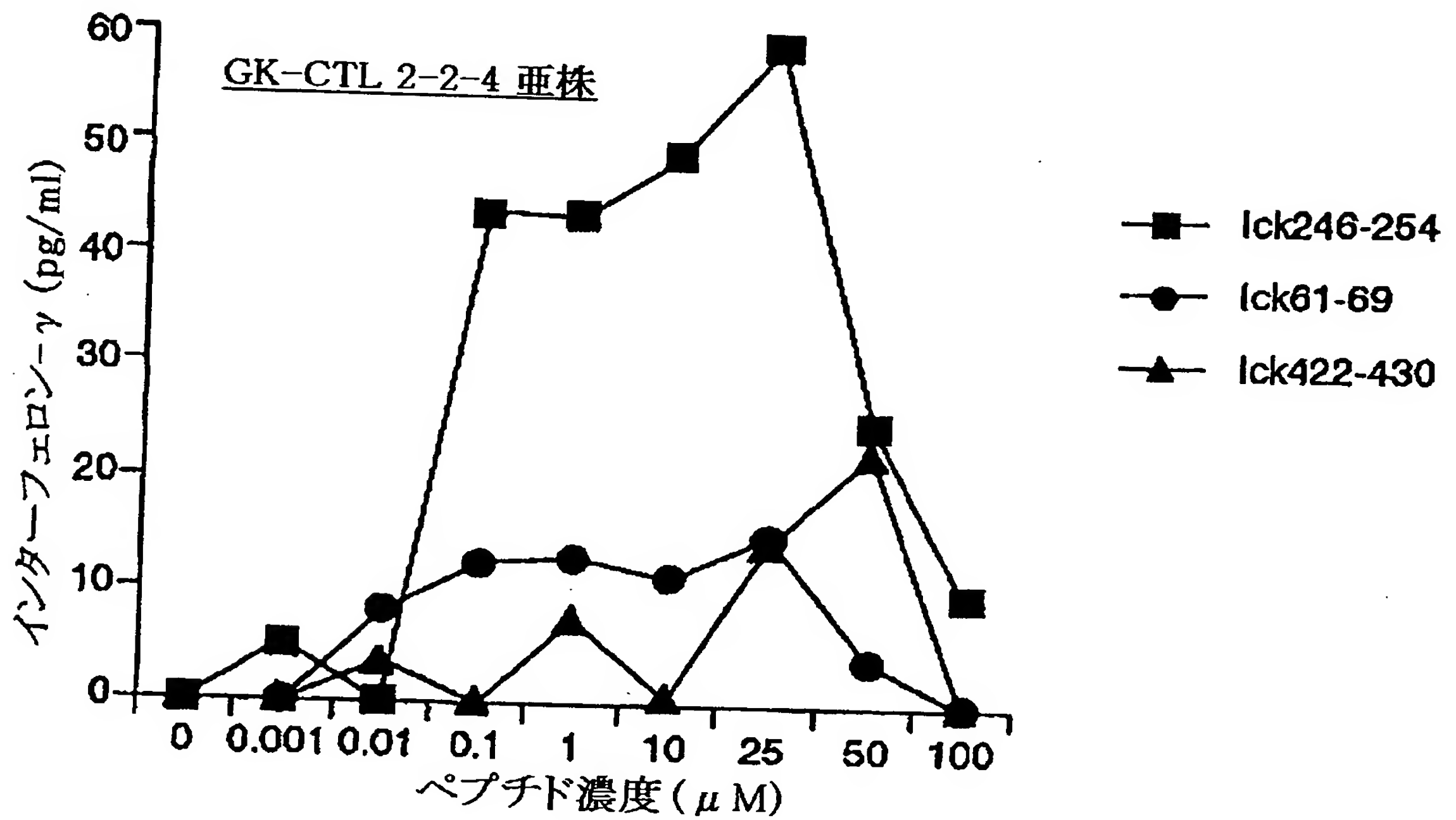


図 14

(A)



(B)





(C)

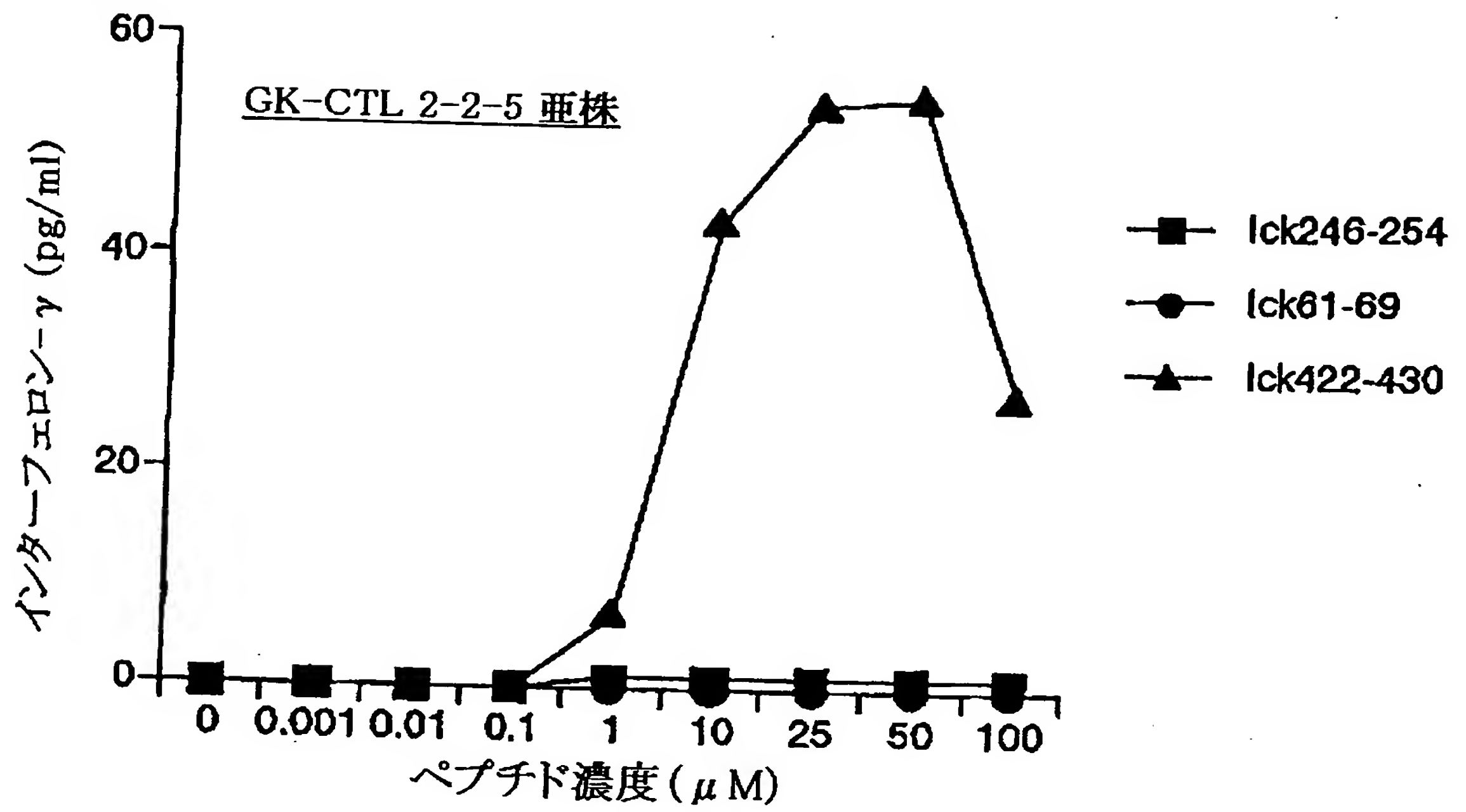
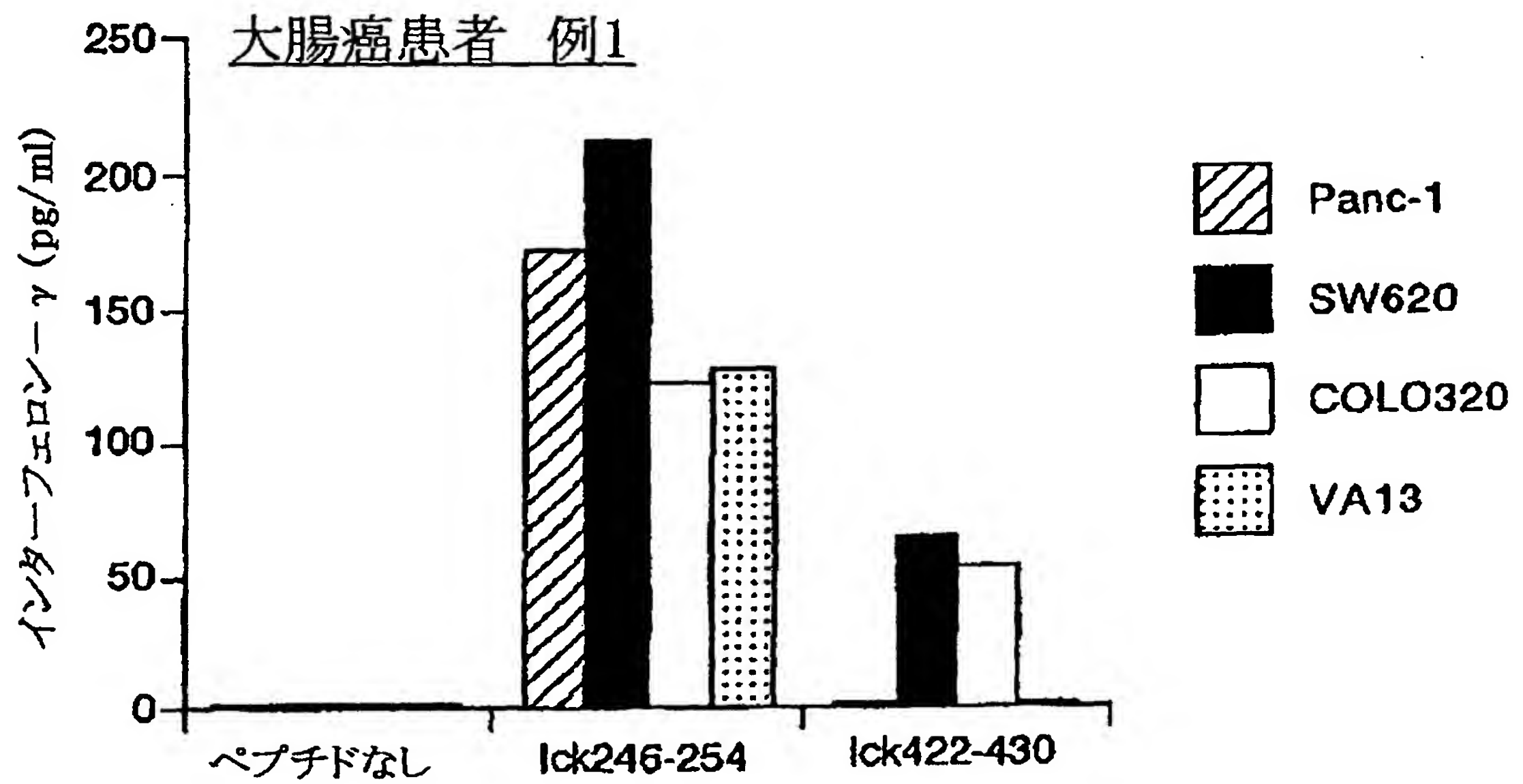


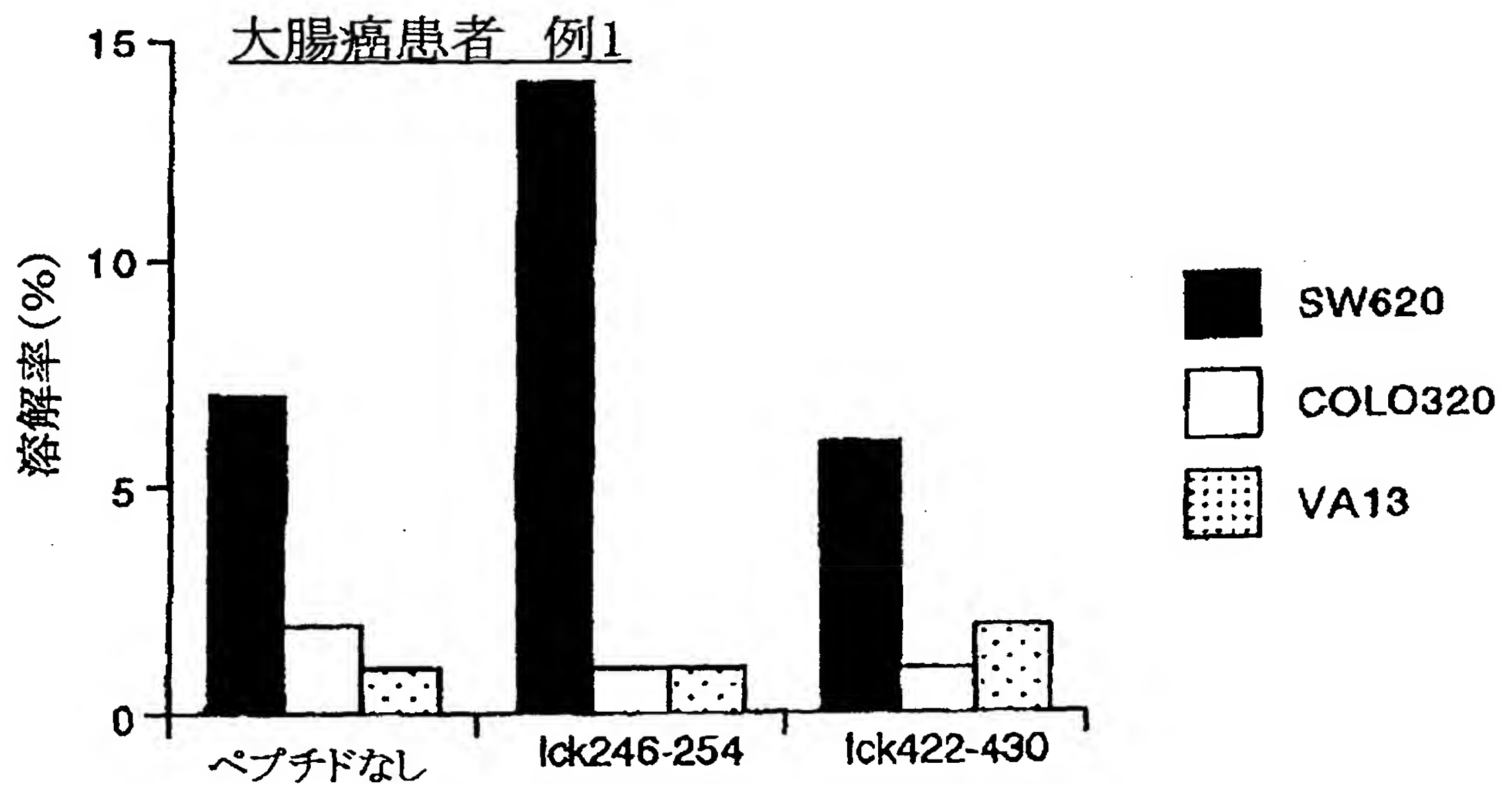


図 15

(A)

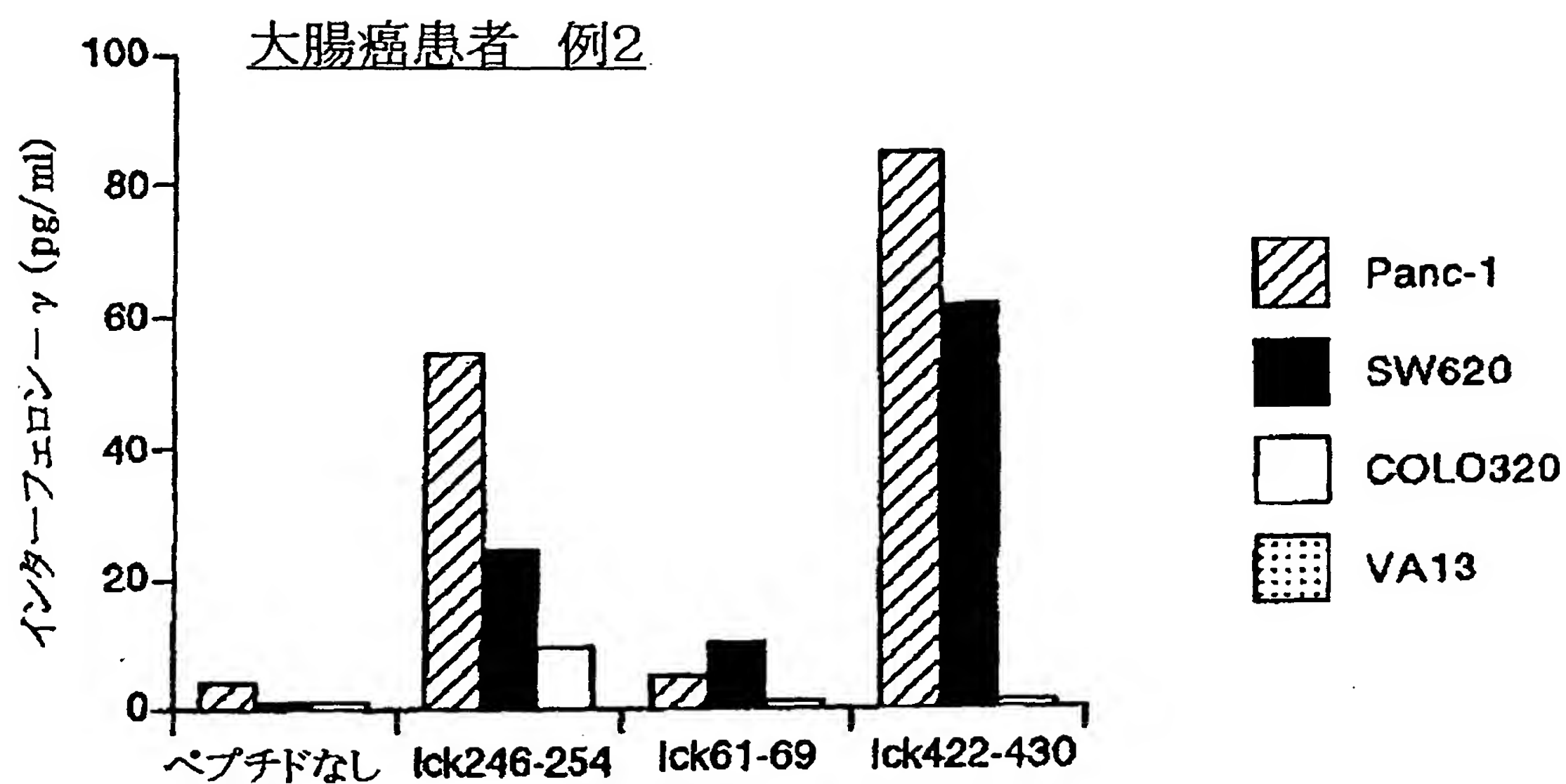


(B)

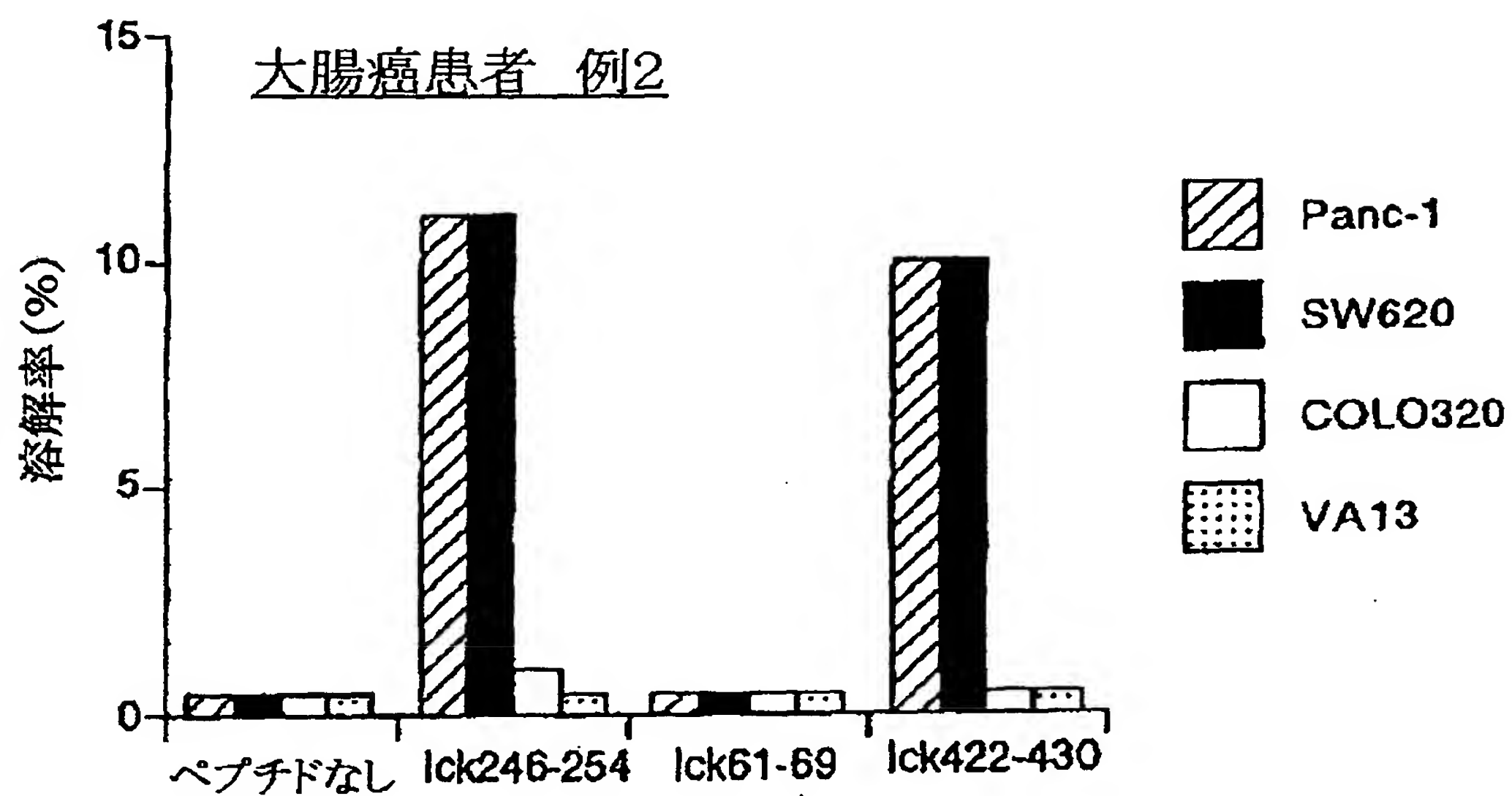




(C)



(D)





配列表

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Itoh, Kyogo

&lt;120&gt; Tumor antigen

&lt;130&gt; GP00-1017

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 17

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

Thr	Phe	Asp	Tyr	Leu	Arg	Ser	Val	Leu
1					5			

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Asp	Tyr	Leu	Arg	Ser	Val	Leu	Glu	Asp	Phe
1				5					10

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 3

His	Tyr	Thr	Asn	Ala	Ser	Asp	Gly	Leu
1				5				

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 9



<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 4  
Thr Phe Glu Tyr Leu Gln Ala Phe Leu  
1 5

<210> 5  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 5  
Thr Phe Glu Tyr Ile Gln Ser Phe Leu  
1 5

<210> 6  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 6  
Thr Phe Glu Tyr Leu Gln Ser Phe Leu  
1 5

<210> 7  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 7  
Thr Phe Asp Tyr Leu Gln Ser Val Leu  
1 5

<210> 8  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 8  
Thr Phe Glu Tyr Ile Gln Ser Val Leu  
1 5



<210> 9  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 9  
 Thr Phe Glu Phe Leu Gln Ser Val Leu  
       1                              5

<210> 10  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Designed peptide based on amino acid sequence of  
       Src family tyrosine kinases, which peptide has an  
       ability to generate HLA-A24 restricted cytotoxic T  
       lymphocytes

<220>  
 <221> UNSURE  
 <222> (3)  
 <223> Xaa can be Asp or Glu.

<220>  
 <221> UNSURE  
 <222> (4)  
 <223> Xaa can be Tyr or Phe.

<220>  
 <221> UNSURE  
 <222> (5)  
 <223> Xaa can be Leu or Ile.

<220>  
 <221> UNSURE  
 <222> (6)  
 <223> Xaa can be Arg or Gln.

<220>  
 <221> UNSURE  
 <222> (7)  
 <223> Xaa can be Ser or Ala.

<220>  
 <221> UNSURE



<222> (8)

<223> Xaa can be Val or Phe.

<220>

<221> UNSURE

<222> (10)

<223> Xaa can be Glu or Asp.

<220>

<221> UNSURE

<222> (12)

<223> Xaa can be Phe or Tyr.

<220>

<221> UNSURE

<222> (13)

<223> Xaa can be Phe or Tyr.

<400> 10

Thr	Phe	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Leu	Xaa	Asp	Xaa	Xaa
1				5						10		

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Leu	Gln	Asp	Asn	Leu	Val	Ile	Ala	Leu
1				5				

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Lys	Leu	Val	Glu	Arg	Leu	Gly	Ala	Ala
1				5				

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens



&lt;400&gt; 13

Gln Leu Gln His Gln Arg Leu Val Arg Leu  
1 5 10

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 14

Lys Leu Leu Asp Met Ala Ala Gln Ile  
1 5

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 15

Gln Ile Ala Glu Gly Met Ala Phe Ile  
1 5

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 16

Asp Val Trp Ser Phe Gly Ile Leu Leu  
1 5

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 17

Ser Val Leu Glu Asp Phe Phe Thr Ala  
1 5